

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie

Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von löslichem CEACAM8 und CEACAM1 auf naiven B-Zellen und aktivierten Lymphozyten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Miriam Kellich
aus Hattingen
2013

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer
1.Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Bernhard B. Singer
2.Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. medic. V. Rebmann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2014

2nd European Congress of Immunology September 13 - 16, 2009 in Berlin
Granulocyte-derived CEACAM8: potential therapeutic agent with pleiotropic effects
Singer, B.B., Scheffrahn, I., Klaile, E., Muller, M.M., Gunasekeran, S., Kellich, M.,
Öbrink, B. and Ergün, S.

Posterpreis der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Forschungstag
November 2009
The functional impact of soluble CEACAM8 on T- and B- Lymphocytes
Miriam Kellich, Sinduja Gunasekeran, Inka Scheffrahn, Süleyman Ergün and Bernhard B.
Singer

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Adhäsionsmoleküle	1
1.2 Die CEACAM-Familie	2
1.3 CEACAM1	3
1.3.1 Struktur, Aufbau und funktionelle Aspekte.....	3
1.3.2 Expressionsmuster und Funktionen.....	7
1.3.2.1 CEACAM1 als Zelladhäsionsmolekül	7
1.3.2.2 CEACAM1 und Endothelzellen.....	8
1.3.2.3 CEACAM1 und Epithelzellen.....	9
1.3.2.4 CEACAM1 und Immunzellen.....	10
1.3.2.4.1 Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen.....	10
1.3.2.4.2 T-Zellen.....	11
1.3.2.4.3 B-Zellen.....	13
1.3.2.5 CEACAM1 als Korezeptor	14
1.3.2.6 CEACAM1 als Pathogenrezeptor	14
1.4 CEACAM6	15
1.5 CEACAM8	16
1.6 Weitere Vertreter der CEACAM-Familie.....	17
1.7 Ziel der Arbeit.....	18
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	 20
2.1 Material	20
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.2 Chemikalien.....	20
2.1.3 Stammlösungen und Puffer	22
2.1.4 Kits	23
2.1.5 Enzyme und Marker	24
2.1.6 Primer	24
2.1.7 Plasmide	25
2.1.8 Zytokine und Stimulanzen.....	25
2.1.9 Antikörper.....	26
2.1.9.1 Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse.....	26
2.1.9.2 Antikörper und Fc-Konstrukte für die T- und B-Zell-Proliferation	27
2.1.9.3 Antikörper zur Proteindetektion im Western Blot	27
2.1.10 Zellen und Medium	27
2.1.11 Geräte.....	28
2.1.12 Software.....	29
2.2 Methoden	29
2.2.1 Zellbiologische Methoden	29
2.2.1.1 Isolation peripherer Blutzellen	29
2.2.1.2 Monozytenentfernung	31
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	32
2.2.1.4 Zellstimulation und Zellkultur	32
2.2.2 Immunologische Methoden	34
2.2.2.1 Durchflusszytometrische Analyse.....	34
2.2.2.2 Detektion der toten Zellen.....	37

2.2.2.3	BrdU-Proliferationsassay	37
2.2.3	Proteinbiochemische Analyse.....	40
2.2.3.1	Zell-Lyse	40
2.2.3.2	Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese	40
2.2.3.3	Western Blot.....	42
2.2.3.4	Detektion spezifischer Proteinfraktionen	43
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.4.1	RNA-Isolation	44
2.2.4.2	Reverse Transkription	45
2.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	47
2.2.5	Statistische Analyse	47
3.	ERGEBNISSE	48
3.1	Charakterisierung des Testsystems.....	48
3.1.1	Zellausbeute.....	48
3.1.2	Zusammensetzung der PBMCs	48
3.2.	Qualitative Analyse der Zellstimulation durch IL2, IL7 und αCD3/αCD28 ...	49
3.3	CEACAM-Expressionsmuster in aktivierten und naiven PBMCs	53
3.3.1	CEACAM1-Expression in der Durchflusszytometrie	53
3.3.2	CEACAM6-Expression in der Durchflusszytometrie	57
3.3.3	CEACAM1- und CEACAM6-Expression im Western Blot	61
3.3.4	Expression der CEACAM1-Isoformen und CEACAM6 in der PCR.....	63
3.4.	Der Einfluss von löslichem CEACAM8 auf naive PBMCs.....	67
3.4.1	Ergebnisse des B-Zell-Proliferationsassays.....	67
3.4.2	Ergebnisse des T-Zell-Proliferationsassays.....	70
3.5	Der Einfluss von löslichem CEACAM8 auf aktivierte PBMCs.....	72
4.	DISKUSSION	77
4.1	IL2, IL7 und αCD3/αCD28 als potente Induktoren der CEACAM1- und CEACAM6-Expression in PBMCs.....	77
4.2	CEACAM6-Induktion und CEACAM1-Isoformexpression	80
4.3	Membranständiges CEACAM1 ist ein wichtiges Regulatormolekül lymphozytärer Funktionen	82
4.4	Die Bedeutung von löslichem CEACAM8 als physiologischer CEACAM1-Ligand.....	86
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	88
6.	LITERATURVERZEICHNIS	89
ANHANG	94	
DANKSAGUNG	99	
LEBENS LAUF	100	

1. EINLEITUNG

1.1 Adhäsionsmoleküle

Für die Organisation von Zellen in einem multizellulären Gewebe und ihre komplexen Wechselwirkungen sind Zelladhäsionsmoleküle unabdingbar. Die Verbindungen zwischen den Zellen regulieren die Architektur und Festigkeit des Gewebes, grenzen verschiedene Körperräume voneinander ab und sind beteiligt an Morphogenese sowie Gewebsregenerierung. An den homophilen und heterophilen Zell-Zell-Interaktionen sind im Wesentlichen vier Strukturfamilien beteiligt (Abb. 1): Integrine, Selektine, Cadherine und die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (Ruoslahti und Öbrink, 1996). Während Integrine und Cadherine an starken interzellulären Bindungen beteiligt sind, vermitteln Selektine und die Moleküle der IgSF eher schwächere Bindungen und agieren vielmehr als Adhäsions-Rezeptoren, indem sie Signalkaskaden initiieren oder beeinflussen. Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) ist eine heterogene Gruppe von Molekülen mit einem breiten Expressionsmuster. Klassische Vertreter dieser Gruppe sind der B-Zell-Rezeptor (BZR) und der T-Zell-Rezeptor (TZR). Ein weiterer Vertreter der IgSF ist die CEA (*carcinoembryonic-antigen*)-Familie.

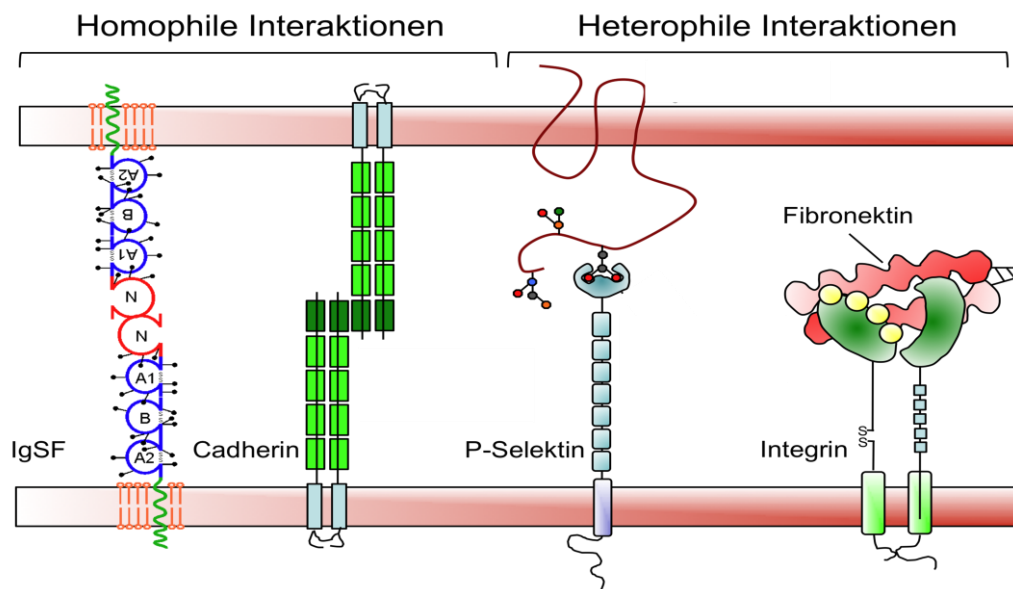


Abbildung 1: Die vier Hauptvertreter der Adhäsionsmoleküle. Zelladhäsionsmoleküle sind beteiligt an Zell-Zell-Kontakten und bilden sowohl homophile als auch heterophile Bindungen aus. Die Hauptvertreter sind Integrine, Selektine, Cadherine und die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).

1.2 Die CEACAM-Familie

Als Teil der Immunglobulin-Superfamilie ist die CEA-Familie beteiligt an interzellulären Bindungen. Kodiert durch insgesamt 29 Gene auf dem humanen Chromosom 19q13.2 (Hammarström, 1999), lässt sich die CEA-Familie in 2 Subgruppen unterteilen: Die *pregnancy-specific glycoproteins* (PSGs) werden von Synzytiotrophoblasten der Plazenta in die mütterliche Zirkulation sekretiert (Beauchemin et al., 1999). Die hauptsächlich membrangebundenen *carcinoembryonic-antigen-related cell-adhesion molecules* (CEACAMs) (Abb. 2), als die zweite Subgruppe, repräsentieren multifunktionelle Adhäsionsrezeptoren. Sie haben pleiotrope Effekte auf die meisten Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen (Öbrink, 1997). Alle 12 Mitglieder der CEACAM-Familie zeichnen sich durch eine N-terminale IgV-ähnliche Domäne aus, die der variablen (V) Region von Immunglobulinen strukturell ähnelt. Sie besteht aus 180 Aminosäuren. Je nach Mitglied der humanen CEACAM-Familie folgt eine variable Anzahl an IgC2-ähnlichen Domänen, welche an die konstanten (C) Typ 2 Regionen der Immunglobuline erinnern. Hier lassen sich zwei Domänen mit je 93 Aminosäuren (Typ A) oder 85 Aminosäuren (Typ B) unterscheiden (Abb. 2) (Hammarström, 1999). Des Weiteren weisen alle CEACAMs eine ausgeprägte Glykosylierung ihrer Asparaginreste durch multikomplexe Kohlenhydratketten auf, welche bis zu 50 % ihrer molekularen Masse ausmachen (Hammarström, 1999; Lucka et al., 2005). CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 sind über eine transmembrane Domäne in der Zellmembran verankert und können so potenziell Signale direkt in das Zytoplasma weiterleiten. Die Verankerung über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, wie bei CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8, konnte bisher nur in humanen Zellen nachgewiesen werden (Öbrink, 1997). Obwohl der Mechanismus noch nicht gänzlich geklärt ist, sind diese CEACAMs in der Lage Signalkaskaden anzustoßen, benötigen dazu aber wahrscheinlich transmembrane Partnermoleküle. Die am besten untersuchten Mitglieder sind bisher CEACAM1 bis CEACAM8 (Abb. 2).

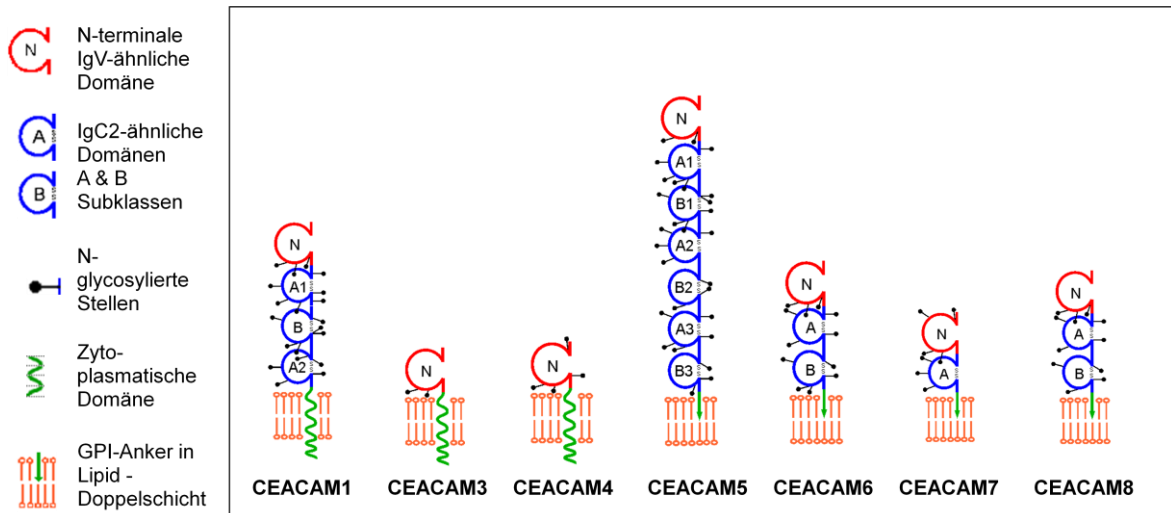


Abbildung 2: Struktur und potentielles Glykosylierungsmuster der Hauptvertreter der CEACAM-Familie. Jeder Rezeptor besteht aus einer aminoterminalen IgV-ähnlichen Domäne. Je nach Mitglied der CEACAM-Familie folgen 0-6 extrazelluläre IgC2-ähnliche Domänen der Subklassen Typ A oder Typ B. Die einzelnen Vertreter der CEACAM-Familie können entweder über eine hydrophobe Transmembrandomäne oder einen GPI-Anker in der Membran verankert sein (GPI = Glykosylphosphatidylinositol). Abb. verändert übernommen nach CEA Homepage, <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>.

1.3 CEACAM1

1.3.1 Struktur, Aufbau und funktionelle Aspekte

Humanes CEACAM1 wurde erstmalig 1976 von Svenberg in humaner Galle als *Biliary glycoprotein* (Bgp) beschrieben. Auf Grund seiner Homologie in allen bisher untersuchten Spezies gilt das auch als CD66a (*cluster of differentiation* 66a) bekannte CEACAM1 als Gründermolekül der CEACAM-Familie. Bedingt durch unterschiedliche zellspezifische Glykosylierungsmuster schwankt das Molekulargewicht von CEACAM1 zwischen 120 und 160 kDa. Obwohl es sich wie die meisten CEA-Familienmitglieder aus einer N-terminalen IgV-ähnlichen Domäne, gefolgt von IgC2-ähnlichen Domänen zusammensetzt, gewinnt CEACAM1 durch die Existenz von 12 Splice-Varianten an zusätzlicher Komplexität (Abb. 3). Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen sowie ihrer Membranverankerung bzw. der Länge ihrer zyttoplasmatischen Domäne (Beauchemin et al., 1999). So besitzt CEACAM1-4 vier extrazelluläre Domänen und weist entweder einen kurzen zyttoplasmatischen Schwanz mit 10 Aminosäuren (CEACAM1-4S) oder einen längeren mit 73 Aminosäuren

(CEACAM1-4L) auf. Weitere häufig koexprimierte Isoformen sind CEACAM1-3S bzw. CEACAM1-3L. Die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Anzahl an extrazellulären Domänen bleibt weiterhin unklar. Für Epithelzellen ist allerdings beschrieben, dass die Länge der zytoplasmatischen Domäne einen wichtigen Einfluss auf die zelluläre Signalantwort hat (Öbrink, 1997; Singer et al., 2000; Singer et al., 2010). Der lange zytoplasmatische Schwanz enthält zwei phosphorylierbare ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*)-Sequenzen, die durch Interaktion mit Tyrosin-Phosphatasen und Kinasen über Phosphorylierung und Dephosphorylierung intrazelluläre Signale vermitteln. Dies stellt den initialen Schritt der CEACAM1-vermittelten Signaltransduktion dar. Die CEACAM1-S-Formen hingegen weisen keine solche Sequenz auf (Öbrink, 1997; Gray-Owen und Blumberg, 2006). In einigen CEACAM1-exprimierenden Zellen werden sowohl die L- als auch die S-Isoformen koexprimiert. Hierbei ist die Expressionsstärke und das Verhältnis beider Isoformen zueinander nicht statisch, sondern abhängig vom Zelltyp, Proliferationsstatus (konfluent /nicht konfluent) und Aktivierungszustand der Zellen (Singer et al., 2000; Greicius et al., 2003). Nicht nur das absolute CEACAM1-Expressionslevel, sondern auch das Verhältnis seiner Isoformen zueinander, hat Einfluss auf die CEACAM1-vermittelten Effekte. Unterschiedliche Expressionsmuster der L- und S-Isoformen auf ruhenden im Vergleich zu proliferierenden Epithelzellen zeigen den wichtigen Einfluss des L/S-Quotienten auf die Regulation der Zellproliferation (Singer et al., 2000; Singer et al., 2010). Des Weiteren entscheidet das optimale Verhältnis der Isoformen zueinander über den inhibitorischen Effekt von CEACAM1 als Tumorsuppressor in Kolonkarzinom-Zellen. Hierbei scheinen die Signaleigenschaften der langen Isoform durch die kurze scheinbar modifiziert zu werden (Turbide et al., 1997). Ähnliche Beobachtungen liegen auch für Adenokarzinomzellen der Lunge vor. Die durch CEACAM1-4L-vermittelte Kontaktinhibition wird durch die Expression von CEACAM1-4S gestört, was in einer malignen Transformation der Zellen resultiert (Singer et al., 2010). Das unterschiedliche Expressionsmuster der Isoformen zueinander scheint somit ein möglicher Ansatz für die Regulation der CEACAM1-vermittelten Signalkaskaden zu sein.

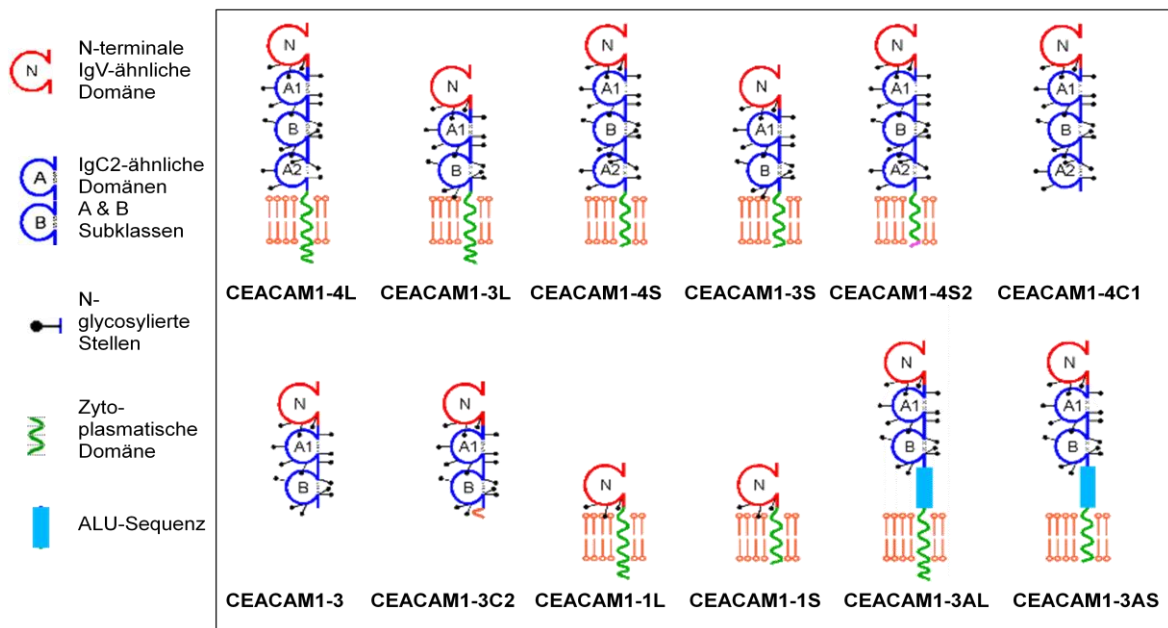


Abbildung 3: Die CEACAM1-Splice-Varianten. Durch alternatives Splicing der neun Exons des CEACAM1-kodierenden Genoms ergeben sich 12 Isoformen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anzahl an extrazellulären Domänen und ihrer Membranverankerung bzw. der Länge ihrer intrazellulären Domäne. Nach den Regeln der Nomenklatur stehen die Zahlen für die unterschiedliche Anzahl an extrazellulären Domänen, die Buchstaben für die lange (L) oder die kurze (S) zytoplasmatische Domäne. Die am häufigsten exprimierte Isoformen sind CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S. Abb. verändert übernommen nach CEA Homepage, <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Regulation der Signalmechanismen ist, dass sowohl die CEACAM1-Isoformen untereinander dimerisieren, als auch dass CEACAM1 mit anderen Familienmitgliedern Komplexe bildet (Öbrink, 1997; Stocks et al., 1996, Singer et al., 2002) (Abb. 4). Auf Epithelzellen ist CEACAM1 meist als *cis*-Homodimer zu finden. Sowohl die extrazellulären Domänen als auch die zytoplasmatischen Domänen sind an der Dimerisierung beteiligt (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Durch die Dimerbildung wird, möglicherweise auf Grund sterischer Hinderung, die Fähigkeit des Rezeptors Signalmoleküle zu rekrutieren und intrazelluläre Signalkaskaden anzustoßen beeinflusst (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Das Ausmaß der Dimerisierung kann von der Zelle reguliert werden. Sowohl die S- als auch die L-Form verfügt über eine Calmodulin-Bindungsstelle und ein Binden von Kalzium-aktiviertem Calmodulin führt zu einer

Dissoziation der Dimere (Gray-Owen und Blumberg, 2006) (Abb. 4A). Die Dimere stehen in einem Equilibrium mit den Monomeren. Daher beeinflusst sowohl das allgemeine CEACAM1-Expressionslevel als auch eine Verschiebung im Expressionsmuster der Isoformen das Monomer/Dimer Verhältnis (Müller et al., 2009a). Auch eine Komplexbildung unterschiedlicher CEACAM-Mitglieder ist möglich (Abb. 4 B). Somit scheint auch die Koexpression anderer CEACAM-Mitglieder für das funktionelle Ergebnis der CEACAM1-vermittelten Signale eine Rolle zu spielen.

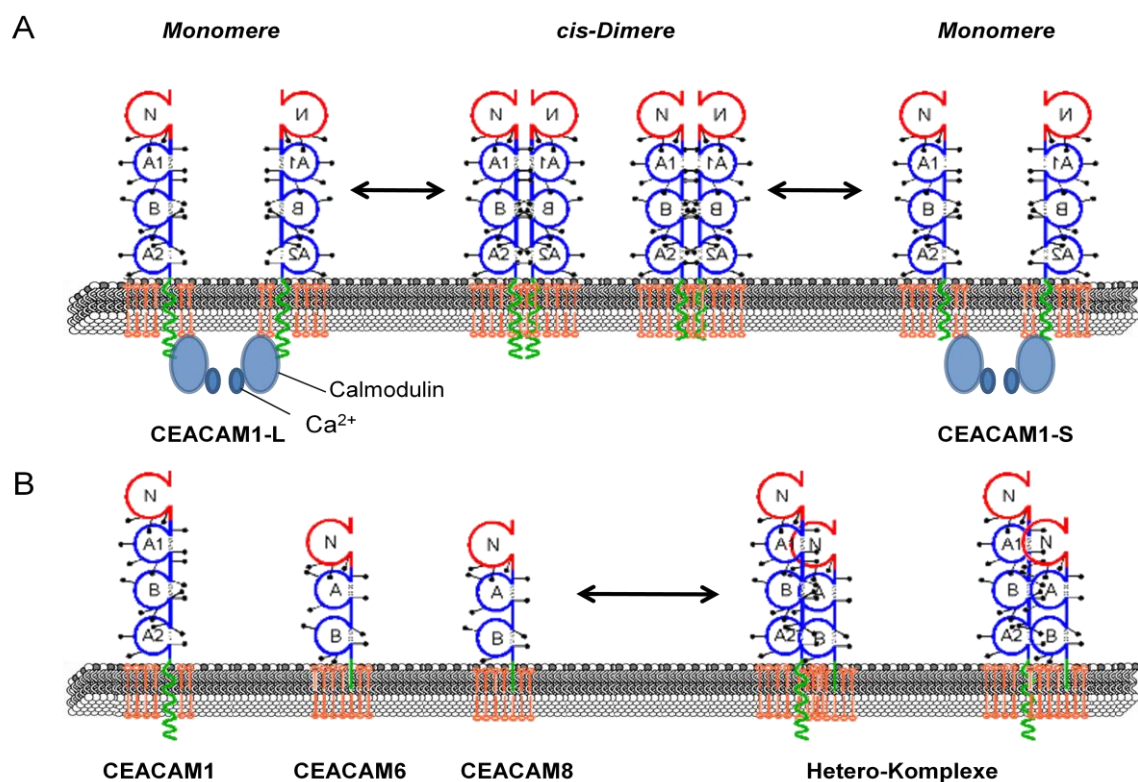


Abbildung 4: Intrazelluläre Dimerisierung und Komplexbildung von CEACAM1. (A) Dimere und Monomere stehen miteinander im Gleichgewicht, welches unter anderem durch das Isoformenverhältnis beeinflusst wird. Sowohl CEACAM1-S als auch CEACAM1-L besitzen eine Calmodulin Bindungsstelle. Die Bindung von Kalzium-aktiviertem Calmodulin an die Untereinheiten führt zu einer Dissoziation der Dimere. (B) CEACAM1 geht mit GPI-verankerten CEACAM-Mitgliedern Komplexe ein. Dadurch sind sie in der Lage, CEACAM1-vermittelte Signalwege zu beeinflussen oder selbst Signale in die Zelle weiterzuleiten. Abb. modifiziert nach Gray-Owen und Blumberg, 2006.

Der CEACAM1-Signalmechanismus wird somit durch ein komplexes, dynamisches Netzwerk von Regulationsmechanismen beeinflusst, die eine mögliche Erklärung für die

pleiotropen Effekte dieses CEACAM-Moleküls liefern. Der Aktivierungszustand der Zelle, das CEACAM1-Expressionslevel und -Isoformenverhältnis, das Equilibrium zwischen Dimeren und Monomeren und möglicherweise auch die Struktur der extrazellulären Domänen mit ihren zellspezifischen Glykosylierungsmustern beeinflussen die CEACAM1-vermittelten Effekte. Durch direkte Interaktion der zytoplasmatischen Domänen mit dem Zytoskelett (Gray-Owen und Blumberg, 2006) sind weitere Regulationsmechanismen denkbar.

1.3.2 Expressionsmuster und Funktionen

Als anzestrales Gründermolekül der CEACAM-Familie weist CEACAM1 unter allen anderen Mitgliedern das breiteste Expressionsspektrum auf. Während es auf Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen zu finden ist, werden andere CEACAM-Mitglieder nur von einigen Zellen selektiv exprimiert. Während beispielsweise Endothelzellen CEACAM1 als einzigen Vertreter der CEACAM-Familie exprimieren, treten CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 interessanterweise nicht ohne die Koexpression von CEACAM1 auf. Somit scheint CEACAM1 eine besondere Rolle für die Funktionalität anderer CEACAM-Mitglieder zu spielen. CEACAM1 reguliert zelluläre Aktivitäten wie Apoptose, Tumorwachstum, Zellproliferation, Differenzierung und Angiogenese. Seine Rolle im Immunsystem gewinnt in den letzten Jahren immer mehr an Aufmerksamkeit.

1.3.2.1 CEACAM1 als Zelladhäsionsmolekül

CEACAM1 fungiert als interzelluläres Adhäsionsmolekül. Obwohl es hauptsächlich *trans*-homophile Bindungen eingeht (CEACAM1-CEACAM1), kann es auch durch *trans*-heterophile Bindung über CEACAM6, CEACAM5 oder CEACAM8 mit anderen Zellen interagieren (Öbrink, 1997; Hammarström, 1999; Singer et al., 2002). Die interzelluläre Bindung wird über ein nicht-glykosyliertes β -Faltblatt der N-terminalen Domäne vermittelt. Obwohl bekannt ist, dass Monomere homophile Zell-Zell-Interaktionen vermitteln, bleibt unklar, ob *cis*-Dimere interzelluläre Bindungen eingehen können, oder ob sie vorher dissoziieren müssen (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Da im Vergleich mit anderen Adhäsionsmolekülen die CEACAM-vermittelten Bindungen eher schwach sind und Epithelzellen CEACAM1 vor allem an ihrem apikalen Pol aufweisen (Öbrink, 1997;

Hammarström, 1999), fungiert CEACAM1 eher als eine Art Sensormolekül, welches zelluläre Signalwege reguliert. CEACAM1 interagiert auch mit anderen Proteinen wie beispielsweise E-Selektin (Öbrink, 1997), $\beta 3$ -Integrin (Brümmer et al., 2001), Actin und Tropomyosin (Schumann et al., 2001) oder mit Oberflächenmolekülen einiger Pathogene (Sadarangani et al., 2011) (1.3.2.5).

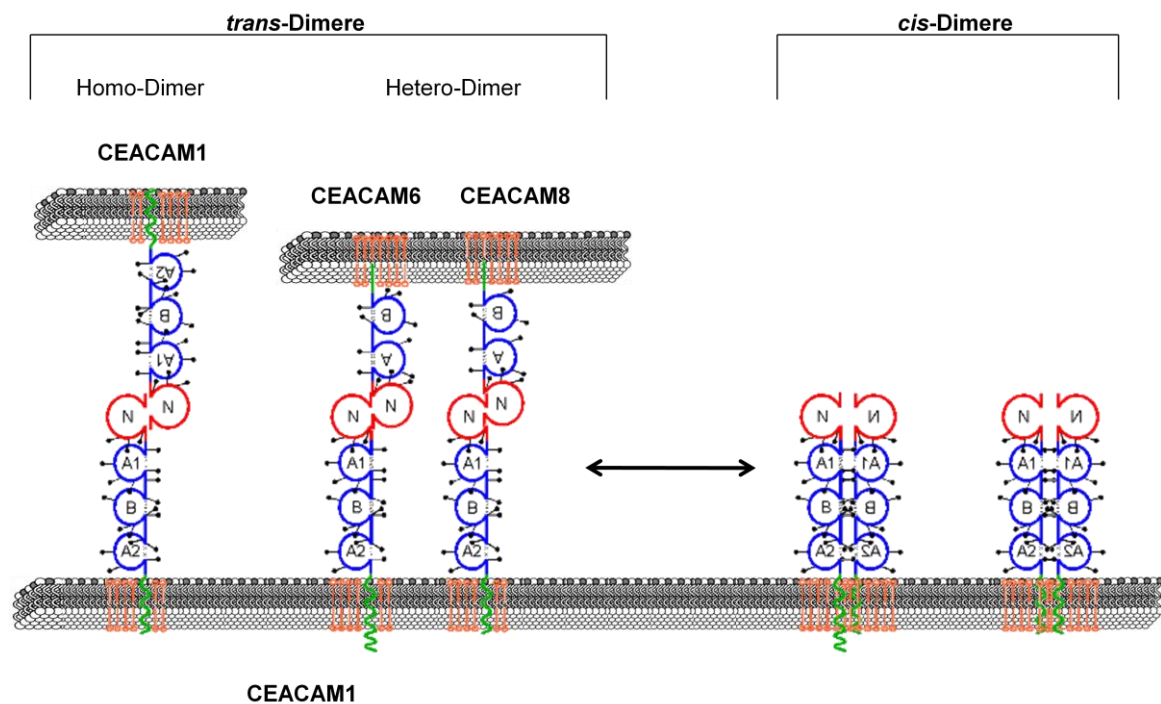


Abbildung 5: Inter- und intrazelluläres Bindungsmuster von CEACAM1. Als Adhäsionsmolekül geht CEACAM1 mit anderen Zellen *trans*-homophile (CEACAM1-CEACAM1) und *trans*-heterophile (z.B. CEACAM1-CEACAM6 bzw. CEACAM8) Bindungen ein, vermittelt über die N-terminale Domäne. Ob cis-Dimere, so wie hier für Monomere dargestellt, an diesen Bindungen beteiligt sind, oder ob sie vorher dissoziieren müssen, bleibt offen. Abb. modifiziert nach Gray-Owen und Blumberg, 2006.

1.3.2.2 CEACAM1 und Endothelzellen

CEACAM1 wird in hohem Maß in Mikrokapillaren von proliferierenden und regenerativen Geweben wie Endometrium, Granulationsgewebe oder Tumoren exprimiert (Ergün et al., 2000b). Interessanterweise zeigen nur kleine, unreife Kapillaren eine signifikante CEACAM1-Expression (Ergün et al., 2000b), was dessen Rolle als angiogenetischen Faktor vermuten lässt. Tatsächlich stimuliert CEACAM1 die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* und induziert Chemotaxis sowie die Formation primitiver

Endothel-Röhrchen. Hierbei übt CEACAM1 einen additiven Effekt zu den durch *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) vermittelten Signalen aus. Allerdings scheint auch ein Großteil der Funktionen, die durch die Bindung dieses Wachstumsfaktors initiiert werden, direkt über CEACAM1 vermittelt zu werden. Neuere Studien zeigen, dass CEACAM1 tatsächlich als Korezeptor des VEGFR-2 fungiert (Nouvion et al., 2010). Auch in lymphatischem Endothel interagiert CEACAM1 mit dem VEGFR-3 und vermittelt proangiogenetische Effekte (Kilic et al., 2007).

1.3.2.3 CEACAM1 und Epithelzellen

Die Effekte von CEACAM1 in Epithelzellen wurden vor allem im Zusammenhang mit malignen Tumoren untersucht. Obwohl die Rolle von CEACAM1 in Krebszellen unterschiedlichen Ursprungs Gegenstand vieler Untersuchungen ist, scheint es noch keine abschließenden Erkenntnisse über dessen generelle Rolle in der Entwicklung und Progression von malignen Tumoren zu geben. Epitheliale Karzinomzellen des Kolons, der Prostata, der Leber, der Brust, Niere und Harnblase (Neumaier, 1993; Öbrink, 2008) zeigen eine Herabregulation von CEACAM1. Diese Beobachtungen unterstreichen die Rolle von CEACAM1 als potentiellen Tumorsuppressor, da eine verminderte Expression von CEACAM1 scheinbar zu einem überschießenden Zellwachstum führt. Konträr zu diesen Befunden zeigen Karzinomzellen der Schilddrüse, des Magens, der Lunge und der Haut eine Hochregulation von CEACAM1, was sich in einer erhöhten Invasivität des Tumorwachstums äußert (Öbrink, 2008). In diesen Tumoren korreliert die CEACAM1 Expressionsstärke mit einer schlechteren Prognose. Diese Beobachtungen, sowie die Tatsache, dass auch das Expressionsmuster der Isoformen einen wichtigen Einfluss auf die CEACAM1-vermittelten Effekte hat (Turbide et al., 1997), zeigen die Komplexität der Tumorregulation durch CEACAM1.

In Hepatozyten ist CEACAM1 an der Regulation des Insulin-Haushaltes beteiligt. Als Rezeptor-Tyrosin-Kinase aktiviert der Insulinrezeptor (IR) als Antwort auf Insulinbindung intrazelluläre Signalkaskaden durch Phosphorylierung spezifischer Effektormoleküle. Auch CEACAM1 gehört zu diesen Effektormolekülen und wird in Hepatozyten als Antwort auf Insulinbindung an seiner intrazellulären ITIM-Domäne phosphoryliert und in den Insulin/IR-Komplex rekrutiert (Poy et al., 2002).

1.3.2.4 CEACAM1 und Immunzellen

Während die Funktion von CEACAM1 bisher intensiv für Epithel- und Endothelzellen untersucht wurde, wird dessen Rolle in der Kontrolle der Immunzellfunktion immer noch kontrovers diskutiert. Das Immunsystem ist ein komplexes zelluläres Netzwerk, bestehend aus der unspezifischen, angeborenen Abwehr als erste Verteidigungslinie sowie der nach 3-4 Tagen einsetzenden spezifischen Abwehr. Für die komplexen Regelmechanismen des Immunsystems sind Zytokine essentiell und spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung der Immunantwort auf bestimmte Noxen. Über Bindung an spezifische Rezeptoren können Zytokine unterschiedlicher Art auf ihren Zielzellen die gleichen Signalkaskaden anstoßen (Redundanz), gleichzeitig kann aber auch ein bestimmtes Zytokin auf verschiedenen Zellen unterschiedliche Wirkungen haben (Pleiotropismus). Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression und führen somit zu Veränderungen in der Zellproliferation, Migration, Differenzierung oder Apoptose. Auch die Expression von Oberflächenmolekülen, wie die Mitglieder der CEACAM-Familie, werden durch Zytokine reguliert. Besonders die Gruppe der Interleukine (IL) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunabwehr.

Es ist bekannt, dass CEACAM1 auf Lymphozyten nach Zytokinaktivierung vermehrt exprimiert wird (Gray-Owen und Blumberg, 2006), wobei genauere quantitative und qualitative Analysen noch ausstehen. Im Gegensatz zu Maus und Ratte exprimieren humane Lymphozyten hauptsächlich die CEACAM1-Isoformen mit langer zytoplasmatischer Domäne (CEACAM1-3L und CEACAM1-4L) und kein (Kammerer et al., 1998; Singer et al., 2002) oder nur marginale Mengen (Chen und Shively, 2004) an CEACAM1-S. Dennoch wurden auch T-Zell-Klone beschrieben, die Transkripte der kurzen Isoform aufweisen (Donda et al., 2000). Insgesamt bleibt das Isoformen-Expressionsmuster auf humanen Lymphozyten jedoch widersprüchlich.

1.3.2.4.1 Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen

Das angeborene Immunsystem wird gegenüber dem spezifischen Immunsystem oft als das primitivere angesehen. Hinsichtlich ihres CEACAM-Expressionsmusters erweisen sich die Zellen der unspezifischen Immunität allerdings als weitaus komplexer als die Vertreter des spezifischen Immunsystems. Neben CEACAM1 exprimieren Granulozyten konstitutiv CEACAM3, CEACAM6 und CEACAM8, die als Komplexe auf der Zelloberfläche

organisiert sein können (Singer et al., 2002; Stocks et al., 1996). Somit weisen sie das breiteste Expressionsmuster an CEACAM-Mitgliedern unter allen Zelltypen auf. Zudem zeichnet sich das CEACAM1 der Granulozyten durch ein weitaus komplexeres Glykosylierungsmuster aus. Mit einem Molekulargewicht von 160 kDa weist das von humanen Granulozyten exprimierte CEACAM1 die funktionell wichtige Kohlenhydratstruktur Sialyl Lewis^x auf, die dem lymphozytären CEACAM1 mit einem Molekulargewicht von 120 kDa fehlt (Kammerer et al., 1998).

CEACAM1, als einziges transmembranes Molekül neben CEACAM3, scheint auf Granulozyten eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Signaltransduktion GPI-verankerter CEACAM-Mitglieder zu spielen. Durch Stimulation mit fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin) oder PMA (*Phorbol myristate acetate*) reagieren humane Neutrophile mit einer vermehrten Expression dieser Oberflächenmoleküle innerhalb weniger Minuten durch Degranulation (Kuroki et al., 1992; Singer et al., 2005). Die Bindung von kreuzverlinkenden Antikörpern an CEACAM1 stimuliert die β 2-Integrin abhängige Aggregation von Granulozyten und induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. (Stocks et al., 1996; Gray-Owen und Blumberg, 2006). Ebenso scheint CEACAM1 ein wichtiger Regulator der Granulopoese zu sein (Pan und Shively, 2010). Außerdem vermittelt die Bindung durch CEACAM1-spezifische Antikörper bzw. durch CEACAM1-Fc-Konstrukte einen anti-apoptotischen Effekt und verzögert sowohl die spontane als auch die Fas-Ligand induzierte Apoptose in Rattengranulozyten (Singer et al., 2005).

Auch aktivierte Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zeigen eine erhöhte Expression von CEACAM1. Eine Inhibition der NK-Zellfunktion konnte durch Antikörperbindung an CEACAM1 gezeigt werden (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Binden von CEACAM1-spezifischen Antikörper an Dendritischen Zellen führt zu deren Reifung und Chemokin-Sekretion. Da sie als antigenpräsentierende Zellen direkt mit den T-Zellen interagieren, wird durch ihre CEACAM1-vermittelte Aktivierung auch das Ausmaß und die Richtung der T-Zell-Antwort beeinflusst (Gray-Owen und Blumberg, 2006).

1.3.2.4.2 T-Zellen

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die erworbene Immunantwort. Anhand ihrer Oberflächenmarker können unterschiedliche Subpopulationen unterschieden werden. Während die CD4⁺ T-Helferzellen (T_H) an der Modulation der Immunantwort durch Zell-

Zell-Interaktion und Zytokinausschüttung beteiligt sind, sind CD8+ zytotoxische T-Zellen für die Abtötung Erreger-infizierter Zellen zuständig. Im Rahmen einer Immunantwort differenzieren die CD4+ Zellen zu T_{H1}- und T_{H2}-Zellen, die sich deutlich in ihrem Zytokinmuster unterscheiden. T-Lymphozyten sind nicht in der Lage, gelöste, native Antigene zu erkennen. Nur Peptidfragmente, die von HLA (*human leucocyte antigen*)-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden, können mittels ihres T-Zell-Rezeptor (TZR)-Komplexes erkannt werden. Der TZR ist dabei mit dem signaltransduzierenden CD3-Komplex assoziiert. Idealerweise müssen zur effektiven Stimulation der T-Zellen mindestens zwei Signale vorhanden sein: Einerseits die Bindung des TZR/CD3-Komplexes an das HLA-präsentierte Antigen, andererseits die Kostimulation des zur IgSF gehörenden CD28 durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (Janeway et al, 2002). Durch alleiniges Binden des Antigens an den TZR/CD3-Komplex verbleibt die Zelle zunächst in einem Zustand der Anergie. Erkennt die T-Zelle ihr Antigen, so ist ihre Aktivierung von der Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle als Liganden des CD28 abhängig. Durch den Mechanismus der Anergie und den mehrstufigen Aktivierungsprozess wird gesundes Gewebe vor einer vorschnellen autoimmunologischen Zerstörung durch T-Zellen geschützt. Der Übergang in die klonale Proliferation wird weiterhin durch proinflammatorische Zytokine, insbesondere Interleukin 2, gefördert.

Auch die Signalübertragung durch CEACAM1 scheint einen Einfluss auf die T-Zell-Funktion zu haben. CEACAM1 wird in geringen Mengen auf ruhenden T-Zellen exprimiert, kann aber durch Zytokinstimulation oder Stimulation des TZR/CD3-Komplexes hochreguliert werden (Kammerer et al., 1998; Gray-Owen und Blumberg, 2006). Obwohl etliche Studien die Rolle des CEACAM1 als Korezeptor des TZR herausstellen, wird sein Effekt auf Zellproliferation und Zellaktivierung immer noch kontrovers diskutiert. Mehrere Arbeitsgruppen zeigen einen koinhibitorischen Effekt von CEACAM1 auf aktivierte T-Zellen, sowohl in humanen als auch in murinen T-Zellen (Kammerer et al. 1998; Boulton und Gray-Owen, 2002; Chen und Shively, 2004; Chen, D. et al., 2004). Durch Bindung CEACAM1-spezifischer Antikörper zeigte sich eine Inhibition der T-Zell-Funktion durch Unterdrückung der Zellproliferation und IL2-Produktion (Chen und Shively, 2004). Durch Ligation von *Neisseria gonorrhoeae* über CEACAM1-spezifisches Opa (*opacity-associated*)-Protein wurde die Aktivierung und Proliferation von isolierten, zuvor aktivierten CD4+ T-Zellen unterdrückt (Boulton und Gray-Owen, 2002). Allerdings gibt es auch andere Studien, die einen kostimulatorischen

Effekt von CEACAM1 auf T-Zellen beschreiben (Kammerer et al., 1998; Donda et al., 2000; Sadarangani et al., 2011).

1.3.2.4.3 B-Zellen

Als Antwort auf eine Immunreaktion zeigen B-Zellen eine Induktion ihrer Proliferation und differenzieren sich im weiteren Verlauf ihrer Aktivierung in Antikörper produzierende Plasmazellen und Gedächtniszellen. Im Gegensatz zu T-Zellen erkennen B-Zellen Antigene in ihrer nativen Form mit Hilfe ihres B-Zell-Rezeptor (BZR)-Komplexes. Dabei besteht der BZR aus einem membrangebundenen Immunglobulin, assoziiert mit zwei Ig α /Ig β heterodimeren Proteinen, die für die Signalübertragung ins Innere der Zelle zuständig sind (Janeway et al., 2002). Analog zu den T-Zellen werden in einem mehrschrittigen Prozess mindestens zwei Signale zur effektiven Aktivierung der B-Zellen benötigt: Einerseits die Antigenbindung an den BZR-Komplex, andererseits die Kostimulation über CD40. Die meisten Antigene, mit Ausnahme von Polysacchariden, sind T-Zell-abhängig. Dies bedeutet, dass es nur durch zusätzliche Signale von T_H-Zellen zu einer Aktivierung naiver B-Zellen und einer Induktion ihrer klonalen Proliferation sowie deren Differenzierung zu Plasmazellen kommt (Janeway et al., 2002). In diesem Zusammenhang spielen B-Zellen auch eine Rolle als professionelle antigenpräsentierende Zellen.

Auch CEACAM1 scheint als Rezeptor die B-Zell-Funktion zu beeinflussen. CEACAM1 wird auf ruhenden B-Zellen konstitutiv exprimiert (Singer et al., 2002) und wird durch Stimulation, beispielsweise mit IL2, hochreguliert (Gray-Owen und Blumberg, 2006; Lobo et al., 2009). Über den Einfluss von CEACAM1 auf die Regulation der B-Zell-Funktion liegen nur wenige Erkenntnisse vor und seine Rolle als BZR-Korezeptor bleibt kontrovers. Verschiedene Studien postulieren einen inhibitorischen Effekt des CEACAM1 auf die B-Zell-Funktion. In einer Studie konnte durch CEACAM1-Bindung von *Neisseria gonorrhoeae* an zuvor aktivierte B-Zellen ein vermehrter Zelltod und eine Inhibition der Antikörperproduktion beobachtet werden (Pantelic et al., 2005). In CEACAM1-defizienten Daudi-Zelllinien zeigte sich, dass ein niedriges CEACAM1-Expressionslevel mit einer Resistenz gegenüber AICD (*activation-induced cell death*) einhergeht (Lobo et al., 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die zytoplasmatische Domäne des CEACAM1-L die zytoplasmatische Domäne des hemmenden Fc γ RIIB-Rezeptors in Hühner-B-Zellen funktionell ersetzen kann und die BZR-vermittelten Signalkaskaden hemmt (Chen et al.,

2001). Im Gegensatz zu diesen inhibitorischen Effekten wurden auch kostimulatorische Effekte des CEACAM1 auf B-Zellen beschrieben. So konnte in einer anderen Studie durch CEACAM1-bindende Antikörper oder bakterielle Opa-Proteine eine Kostimulation der BCR-vermittelten Zellproliferation und Antikörpersekretion sowohl für murine als auch humane Zellen beobachtet werden (Greicius et al., 2003; Sadarangani et al., 2011).

1.3.2.5 CEACAM1 als Korezeptor

Als Zelladhäsionsmolekül vermittelt CEACAM1 Funktionen wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Angiogenese. Wie bereits erwähnt, agiert es aber auch als Korezeptor einer Vielzahl von Zellrezeptoren. Als negativer Korezeptor des *granulocyte colony-stimulating factor receptor* (G-CSFR) beeinflusst CEACAM1 beispielsweise die Reifung von Granulozyten (Pan und Shively, 2010). Ebenso agiert CEACAM1 als negativer Korezeptor der *toll-like-receptor 2* (TLR-2)-vermittelten Immunantwort (Slevogt et al., 2008). Als Oberflächenrezeptoren hauptsächlich auf Zellen der angeborenen Immunabwehr, erkennen TLRs Pathogene über die Bindung spezieller molekularer Muster und setzen so eine Immunreaktion in Gang. Wie bereits erwähnt, dient CEACAM1 aber auch als Korezeptor des VEGFR-2 und VEGFR-3 (1.3.2.2), des Insulin-Rezeptors (1.3.2.3), sowie des TZR (1.3.2.4.2) und BZR (1.3.2.4.3).

1.3.2.6 CEACAM1 als Pathogenrezeptor

Neben CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7 agiert CEACAM1 des Weiteren als Rezeptor für verschiedene humanpathogene Erreger (Sadarangani et al., 2011). Ihre CEACAM-spezifischen Adhäsine ermöglichen den Erregern die Bindung und Invasion in die Wirtszelle. *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* binden mittels ihres Opa-Adhäsins an die N-Domäne des humanen CEACAM1 und interagieren so mit Epithelzellen, Lymphozyten und Granulozyten (Sadarangani et al., 2011; Gray-Owen und Blumberg, 2006). Auch *Moraxella catarrhalis* mit seinem UspA1 (*ubiquitous surface protein A1*), sowie das OmpP5 (*outer membrane protein P5*) des Erregers *Haemophilus influenzae* binden spezifisch an CEACAM1 (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Spezielle Oligosaccharide der CEACAM-Kohlenhydratketten dienen *Escherichia coli* und *Salmonella* ebenso als Bindungsstelle (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Interessanterweise interagieren all diese Pathogene speziesspezifisch ausschließlich mit

humanem CEACAM1. Die pleiotropen Effekte des CEACAM1 sind somit nicht nur auf sein breites Expressionsspektrum, sondern auch auf dessen Funktion als Korezeptor diverser zellulärer Rezeptoren zurückzuführen.

1.4 CEACAM6

Humanes CEACAM6 besteht aus einer für Mitglieder der IgSF typischen N-terminalen IgV-ähnlichen Domäne, gefolgt von zwei IgC2-ähnlichen Domänen des Subtyps A und B und weist eine starke Glykosylierung seiner extrazellulären Domänen auf (Abb. 2). Auf Grund zweier unterschiedlicher Glykosylierungsmuster wird sowohl ein Molekulargewicht von 50 als auch 90 kDa beschrieben (Kuroki et al., 1999). Das auch als CD66c bekannte CEACAM-Mitglied ist über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden (Beauchemin et al., 1999). Obwohl die CEACAM6-Expression auf Epithelzellen sowie auf Granulozyten klar gezeigt werden konnte (Scholzel et al., 2000b; Kuroki et al., 1992), bleibt das Expressionsmuster auf humanen Lymphozyten umstritten. Einige Studien weisen die Existenz von GPI-verankerten CEACAMs auf T- und B-Zellen zurück und verweisen auf CEACAM1 als das einzige von Lymphozyten exprimierte CEACAM-Familienmitglied (Kammerer et al., 1998; Gray Owen und Blumberg, 2006). Während Hanenberg et al. die Expression von CEACAM6 auf Lymphozyten leukämischen Ursprungs beschreiben (Hanenberg et al., 1994), konnte bisher nur eine Studie die Expression von CEACAM6 auf normalen humanen peripheren T- und B-Zellen zeigen (Singer et al., 2002). Obwohl der Mechanismus noch größtenteils unverstanden ist, scheint CEACAM6 als nicht-transmembran-verankertes Molekül in der Lage zu sein, intrazelluläre Signalkaskaden zu beeinflussen. CEACAM6 ist auf Granulozyten im Komplex mit CEACAM1 und CEACAM8 organisiert (Stocks et al., 1996; Singer et al., 2002). Durch Koligation von CEACAM1 und GPI-verankertem CEACAM6 mittels kreuzvernetzender Antikörper werden CEACAM1-vermittelte Signale verstärkt. Somit spielt CEACAM6 eine Rolle in der Vermittlung der β 2-Integrin-abhängigen Adhäsion von Granulozyten an Fibrinogen sowie in der Regulation der CD66-abhängigen Initiierung des *respiratory burst* der Neutrophilen (Stocks et al., 1996).

In Epithelzellen scheint CEACAM6 eine Rolle in der Förderung aberranten Zellwachstums zu spielen. CEACAM6 überexprimierende Pankreaskarzinomzellen zeigten eine erhöhte Proliferationsrate und eine größere Invasivität (Duxbury et al., 2004). In A549-Zellen,

einer Adenokarzinom-Zelllinie der Lunge, zeigten Singer et al. eine Aufhebung der inhibitorischen CEACAM1-4L-vermittelten Effekte durch CEACAM6-Koexpression und eine Induktion der Zellproliferation (Singer et al., 2010). Dies geschieht wahrscheinlich durch direkte oder indirekte Beeinflussung der ITIM-Domäne des CEACAM1-L. Somit scheint CEACAM6 in einigen Epithelzellen als ein potenter Induktor der zellulären Proliferation zu fungieren. Vor diesem Hintergrund wäre eine Klärung der Frage nach der Existenz von CEACAM6 auf Immunzellen von wichtiger Bedeutung.

Durch die Tatsache, dass einige CEACAMs auch in einer löslichen Form existieren, gewinnt die CEACAM-Familie an zusätzlicher Komplexität. Ob dieses Phänomen auf genomisches Splicing oder enzymatische Abspaltung der membranverankerten CEACAMs zurückzuführen ist, bleibt unklar. Auch CEACAM6 existiert in einer nicht GPI-verankerten, löslichen Form. So finden sich erhöhte Serumlevel in Patienten mit Brust-, Leber- und hepatozellulären Tumoren (Kuroki et al., 1999).

1.5 CEACAM8

Mit einem Molekulargewicht von 95 kDa und drei extrazellulären Domänen, einschließlich der N-Domäne, weist das GPI-verankerte CEACAM8 den gleichen Aufbau wie CEACAM6 auf, zeichnet sich aber durch sein spezifisches Kohlenhydratmuster aus (Beauchemin et al., 1999). CEACAM8, auch als CD66b bekannt, wird als ein granulozytenspezifischer Differenzierungs- und Aktivierungsmarker ausschließlich von diesen exprimiert. Im Rahmen des *Priming* (Voraktivierung) von Granulozyten erfolgt eine Hochregulation von CEACAM8 auf deren Oberfläche. So zeigen sich beispielsweise erhöhte Expressionslevel bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (Zhao et al., 2004). Auch als nicht-transmembran-verankertes Molekül kann CEACAM8 intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen. Die Tatsache, dass es auf Granulozyten mit CEACAM1 assoziiert auftritt (Singer et al., 2002), lässt vermuten, dass ein Großteil der CEACAM8-vermittelten Effekte über dieses transmembrane Partnermolekül vermittelt wird. So wird der in Epithelzellen durch CEACAM1 regulierte Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*)-Signalweg in humanen Granulozyten durch alleinige Antikörperbindung an CEACAM8 aktiviert (Singer et al., 2002). Wie auch CEACAM6, ist membrangebundenes CEACAM8 involviert in die Regulation der Granulozyten-Adhäsion an Fibrinogen sowie in das CD66-abhängige *Priming* (Stocks et al., 1996). Des Weiteren vermittelt CEACAM8

eine vermehrte Aggregation von Granulozyten (Stocks et al., 1996). Auch in eosinophilen Granulozyten reguliert CEACAM8 deren Adhäsion und Aktivierung und ist hier mit dem β 2-Integrin CD11b assoziiert. Antikörperbindung an CEACAM8 induziert hier die zelluläre Adhäsion und führt sowohl zu einer Degranulation als auch der Produktion von Hyperoxiden (Yoon et al., 2007). Obwohl die meisten anderen CEACAM-Mitglieder, wie CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM7 als Rezeptoren für humanpathogene Erreger dienen (Sadarangani et al., 2011) (1.3.2.6), konnte interessanterweise bisher kein Pathogen identifiziert werden, das CEACAM8 als zellulären Rezeptor nutzt. Somit nimmt CEACAM8 als einziger nicht pathogen-bindender Rezeptor eine Sonderstellung innerhalb der CEACAM-Familie ein.

Wie bereits für CEACAM6 erwähnt, existiert auch CEACAM8 in einer nicht GPI-verankerten, löslichen Form. Dieser scheint eine besondere Stellung zuzukommen. Durch Priming mittels G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*)/GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) wird die *de-novo* Synthese von CEACAM8 in Granulozyten induziert. Unter fMLP-Stimulation wird CEACAM8 innerhalb weniger Minuten in höherem Maß aus intrazellulären Vesikeln sekretiert als CEACAM1 oder CEACAM6 (Singer et al., unveröffentlichte Daten). Als Reaktion auf die Aktivierung der unspezifischen Immunantwort wird CEACAM8 auch bei bakteriellen Infektionen, Influenza, Operationen (Wundheilung) und Stimulation mit IFN γ (Interferon γ) vermehrt sekretiert (Zhao et al., 2004; Singer et al., unveröffentlichte Daten). Lösliches CEACAM8 bindet neben CEACAM6 mit höchster Affinität an CEACAM1, geht aber keine homophilen Bindungen mit sich selbst ein (Singer et al., unveröffentlichte Daten). Somit stellt es einen physiologischen Liganden dar, der möglicherweise pleiotrope Effekte auf alle CEACAM1-exprimierenden Zellen vermittelt. Ein Einfluss von löslichem CEACAM8 auf die Regulation von Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen und Wundheilung wäre somit denkbar.

1.6 Weitere Vertreter der CEACAM-Familie

Wie bereits für CEACAM1, CEACAM6 und CEACAM8 gezeigt, variiert auch das Expressionsmuster der anderen Vertreter der CEACAM-Familie in Abhängigkeit von Spezies, Zelltyp und Aktivierungszustand der Zellen. Während CEACAM2 ausschließlich in der Maus existiert (Beauchemin et al., 1999), ist die CEACAM3-Expression im

Menschen auf Granulozyten begrenzt und weist allein Affinität zu bakteriellen Adhäsinen auf (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Das wohl bekannteste Mitglied der CEACAM-Familie ist das nur auf Epithelzellen exprimierte CEACAM5, besser bekannt als CEA (*carcinoembryonic antigen*). Seit seiner Entdeckung 1965 durch Gold und Freedman dient CEA als klassischer postoperativer Tumormarker in Serum und Urin mit wichtiger prognostischer Relevanz in der Bewertung kolorektaler Karzinome. Aber auch andere Tumore epithelialen Ursprungs wie das Pankreaskarzinom, Mammakarzinom oder das Lungenkarzinom zeigen eine Überexpression von CEACAM5, resultierend in erhöhten Serumspiegeln dieses CEA-Familienmitgliedes (Hammarström, 1999). Über die Funktion und das Expressionsmuster der neu entdeckten humanen Moleküle CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20 und CEACAM21 ist bisher nur wenig bekannt.

1.7 Ziel der Arbeit

Die *carcinoembryonic-antigen-related cell-adhesion molecules* (CEACAMs) repräsentieren eine Gruppe von multifunktionellen Adhäsionsrezeptoren mit pleiotropen Effekten auf den meisten Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen. Die Rolle von CEACAM1, dem Gründermolekül dieser Proteinfamilie, in humanen Immunzellen wird bisher noch kontrovers diskutiert. Die möglicherweise wichtige Funktion von CEACAM1 als Regulator der Immunzellfunktion zeigt sich in dessen aktivierungsinduzierter Hochregulation auf der Oberfläche von Lymphozyten. Die Untersuchung der durch Zellstimulation bedingten Veränderungen des CEACAM1-Expressionsmusters sowie eine mögliche Expression anderer CEACAM-Mitglieder auf humanen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) ist ein Fokus dieser Arbeit. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage nach der Koexpression von CEACAM6 und ob durch Hochregulation der CEACAM1-Expression durch unterschiedliche Stimuli dessen Isoformenverhältnis beeinflusst wird. Die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse dazu sind umstritten. Da aber gerade diese Faktoren die CEACAM1-vermittelten Effekte zu beeinflussen scheinen, ist eine Klärung dieser Frage für zukünftige Untersuchungen zur CEACAM1-Funktion auf Lymphozyten von großer Bedeutung. Mittels Durchflusszytometrie, Western Blot und RT (Reverse Transkriptase)-PCR sollen naive im Vergleich zu stimulierten PBMCs im Hinblick auf ihre CEACAM1/CEACAM6-Expression und das CEACAM1-Isoformenexpressionsmuster analysiert werden.

Alle bisher postulierten Erkenntnisse zur funktionellen Bedeutung der CEACAM1-Expression auf Lymphozyten wurden über die CEACAM1-vermittelte Adhäsion pathogener Erreger oder künstlich entwickelter CEACAM1-bindender Antikörper gewonnen. Um der Frage nach der Funktion von CEACAM1 auf Lymphozyten besser nachzugehen, soll in dieser Arbeit erstmalig der Effekt eines *physiologischen* CEACAM1-Liganden in Form von löslichem CEACAM8 untersucht werden. Lösliches CEACAM8 wird als Antwort auf Immunreaktionen von Granulozyten sekretiert. Seine lange Halbwertszeit und seine starke Affinität zu oberflächengebundenem CEACAM1 weisen auf seine potentielle Rolle in der Regulation von adaptiven Immunantworten und auf dessen Funktion als Modulator von Entzündungen, Autoimmunkrankheiten und Wundheilungsprozessen hin. Da ins Besondere für B-Zellen nur wenige konträre Daten vorliegen, stellt die Rolle von CEACAM1 als Korezeptor des BZR/CD40-Komplexes einen weiteren Fokus dieser Arbeit dar. Mittels BrdU (Bromdesoxyuridin)-Assay soll der Effekt von löslichem CEACAM8 auf die BZR-vermittelte Zellproliferation untersucht werden.

Alle Beobachtungen zur inhibitorischen Funktion von CEACAM1 in Lymphozyten wurden an zuvor stimulierten Lymphozyten, transformierten Zelllinien oder isolierten T- und B-Zellen gemacht. Vor dem Hintergrund der obigen Überlegungen einer möglicherweise durch Stimulation veränderten CEACAM-Isoformenexpression und Koexpression weiterer CEACAMs, soll in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich zuvor aktivierte von frisch isolierten naiven PBMCs hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber CEACAM1-Stimulation mittels löslichem CEACAM8 unterscheiden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner bio-one, Solingen
Eppendorf Tubes (1 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Whatman, Dassel
Filterpipettenspitzen, SafeSeal-Tips	Biozym, Hessisch Oldendorf
Heparin S-Monovetten, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwell Zellkulturtestplatten (6; 48; 96 Well)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Nitrozellulosemembran	AppliChem, Darmstadt
PCR Reaktionsgefäß, 8-er Softstrips 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
5 ml Rundboden Röhrchen, Falcon™	BD, Heidelberg
Zellkulturschale (96 x 21 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
10 ml Zentrifugenröhrchen, runder Boden	Greiner bio-one, Solingen
50 ml Zentrifugenröhrchen, konischer Boden	Greiner bio-one, Solingen

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
p-Coumarsäure	Sigma, Taufkirchen
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	GeneCraft, Lüdinghausen
Dextransulfat-Natriumsulfat 500	AppliChem, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Gibco, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Serva, Heidelberg
Eisessig	AppliChem, Darmstadt

FCS (<i>fetal calf serum</i>)	PAA Laboratories, Cölbe
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare, München
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	AppliChem, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid), Biotherm™ 10 x Puffer	GeneCraft, Lüdinghausen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaF (Natriumfluorid)	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaOH (Natronlauge)	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PJ (Propidiumjodid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (<i>Sodiumdodecylphosphat</i>)	Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tricin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Thermo, Langenselbold

2.1.3 Stammlösungen und Puffer

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

PBS mit 3% FCS (v/v)

Zell-Lyse

Lyse-Puffer

1 % Triton X-100 (v/v)

150 mM NaCl

1 % Natriumdesoxycholat (w/v)

2 mM EDTA

0,1 % SDS (10%) (v/v)

In 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer

50 mM NaF

Phosphatpuffer 0,01 M (pH 7,2)

0,41 g KH_2PO_4

1,25 g Na_2HPO_4

In 250 ml deionisiertem H_2O

pH-Wert Einstellung mit 1 M NaOH

Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese

Tricin-Gelpuffer (pH 8,45)

0,3 % SDS (w/v)

1 x Anodenpuffer (pH 8,9)

0,2 M Tris-HCl

3 M Tris-HCl

In deionisiertem H_2O

In deionisiertem H_2O

pH-Wert Einstellung mit 1 M NaOH

5 x Lämmli- Puffer

500 mM Tris-HCl

1 x Kathodenpuffer (pH 8,3)

0,1 M Tricin

15 % Glycerol (v/v)

0,1 % SDS (w/v)

15 % SDS (w/v)

0,1 M Tris-HCl

0,125 % Bromphenolblau (w/v)

In deionisiertem H_2O

In deionisiertem H_2O

pH-Wert Einstellung mit 1 M NaOH

Western-Blot

Blot-Puffer (pH 8,4)

133 mM Glycin

12 mM Tris-HCl

In deionisiertem H₂O

pH-Wert Einstellung mit 1M NaOH

Lösung A (Lagerung bei -20°C)

6,8 mM p-Coumarsäure

In DMSO

Lösung B (Lagerung bei -20°C)

1,25 mM Luminol

0,1 M Tris-HCl

In deionisiertem H₂O

Lösung C (Lagerung bei -20 °C)

3 % H₂O₂ (v/v)

In deionisiertem H₂O

Entwicklerlösung

15 µl Lösung A

1 ml Lösung B

3 µl Lösung C

Agarosegelelektrophorese

10 x Ladepuffer

0,1 % Bromphenolblau (w/v)

0,1 % Xylencyanol (w/v)

1,5 mM Tris-HCl

50 mM EDTA

70 % Glycerin (v/v)

In deionisiertem H₂O

50 x TAE-Laufpuffer (pH 8,3)

2 M Tris-HCl

1 M Eisessig

50 mM EDTA

In deionisiertem H₂O

pH-Wert Einstellung mit 1 M NaOH

2.1.4 Kits

Cell Proliferation Biotrack ELISA System	GE Healthcare, München
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Chatsworth, USA
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Chatsworth, USA

2.1.5 Enzyme und Marker

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Range in bp: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100	Fermentas, St. Leon-Rotenburg
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Bad Soden
Page Ruler™ Plus prestained Protein Ladder Range in kDa: 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11	Fermentas, St. Leon-Rotenburg
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA-Polymerase, TrueStart™	Fermentas, St. Leon-Rotenburg

2.1.6 Primer

Transkript/Gen	Primer	Sequenz (5'- 3')	NM-Nummer	T _{ann}
CEACAM1-3L	s	TAG TCA CTG ATA ATG CTC TAC C	NM_001712	62°C
	as	TGA GGG TTT GTG CTG TGT GA	NM_001712	
CEACAM1-3S	s	TAG TCA CTG ATA ATG CTC TAC C	NM_001712	63°C
	as	GTC CTG AGC TGC CGG TCT	NM_001024912	
CEACAM1-4L	s	ACC CTG TCA AGA GGG AGG AT	NM_001712	63°C
	as	TGA GGG TTT GTG CTG TGT GA	NM_001712	
CEACAM1-4S	s	ACC CTG TCA AGA GGG AGG AT	NM_001712	62°C
	as	GTC CTG AGC TGC CGG TCT	NM_001024912	
CEACAM6	s	GTT CTT CTA CTC GCC CAC ACC	NM_002483	61°C
	as	CGT TCC TTT TGA CGC TGA GTA G	NM_002483	
CEACAM8	s	ATC TCA GCC CCT TCC TGC AG	NM_001816	61°C
	as	CAG TTG TAG CCA CGA GGG TC	NM_001816	
GAPDH	s	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG	M878511	61°C
	as	TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC	M878511	

Für die CEACAM6-, CEACAM8- und GAPDH-Amplifikation wurde jeweils ein Primerpaar (s/as) benutzt. Für die Amplifikation der CEACAM1-Isoformen wurden zwei unterschiedliche sense-Primer gebraucht, die jeweils spezifisch für die Anzahl an extrazellulären Domänen sind: Einer der Primer bindet in der A2-Domäne (CEACAM1-4), der andere in der B-Domäne (CEACAM1-3) (s. Abb. 3). Für die Erkennung der L- oder S-Splice-Variante wurden ebenso zwei unterschiedliche antisense Primer verwendet. Der L-Form-spezifische antisense-Primer erkennt Sequenzen im Exon 7, welches nur in der langen Variante vorkommt. Der antisense-Primer zur Amplifikation der S-Isoform bindet

Sequenzen auf beiden Seiten der Splice-Region zwischen Exon 6 und Exon 8 und ist somit spezifisch für die S-Isoform. Für die PCR der einzelnen Isoformen wurden die Primer dann wie oben ersichtlich kombiniert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Dr. hum biol. Inka Scheffrahn, Institut für Anatomie, Uniklinikum Essen, zur Verfügung gestellt. Gearbeitet wurde mit einer 5 µM Stammlösung der Oligonukleotide. Dazu wurden die Primer (Ausgangskonzentration = 100 µM) 1:20 verdünnt.

2.1.7 Plasmide

Plasmide	Vektor	Hersteller
CEACAM1-3 S	pcDNA 3.1 CEACAM1-3S	Inka Scheffrahn
CEACAM1-4L	pcDNA 3.1 CEACAM1-4L	
CEACAM1-3L	pcDNA 3.1 CEACAM1-3L	
CEACAM1-4S	pcDNA 3.1 CEACAM1-4S	
GAPDH	pcDNA 3.1 GAPDH	
CEACAM6	pdKCR CEACAM6	Motomu Kuroki
CEACAM8	pdKCR CEACAM8	

2.1.8 Zytokine und Stimulanzen

Zytokine/Stimulanzen	Konzentration	Hersteller
CEACAM8-Fc	5 µg/ml	Bernhard B. Singer
Ko-Fc (CEACAM1dN-Fc)	5 µg/ml	Bernhard B. Singer
rh (<i>recombinant human</i>)IFN γ	0,25 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
rh (<i>recombinant human</i>)IL2	0,2 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
rh (<i>recombinant human</i>)IL3	0,2 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
rh (<i>recombinant human</i>)IL7	0,2 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
rh (<i>recombinant human</i>)IL8	0,1 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
rh (<i>recombinant human</i>)IL10	0,2 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
LPS (Lipopolysaccharid)	0,001 µg/ml	Alexis, Grünberg
rh (<i>recombinant human</i>)TNF α	0,4 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD3 (Klon MEM-57)	1 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD28 (Klon 15E8)	0,25 µg/ml	ImmunoTools, Friesoythe

CEACAM8 und Ko (Kontroll)-Fc wurden wie in Singer et al., 2005 für CEACAM1 beschrieben generiert und von PD Dr. rer. nat. B.B. Singer zur Verfügung gestellt. Bei dem Ko-Fc handelt es sich um ein N-Domäne-depletiertes CEACAM1-Konstrukt mit Fc-Anhang (CEACAM1dN-Fc), welches keine homophilen Bindungen eingehen kann.

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

Spezifität	Klon	Hersteller
anti-human (α) CEACAM1, FITC	B3 (Maus)	Bernhard B. Singer,
anti-human (α) CEACAM6, FITC	13H10 (Maus)	Aldevron, Freiburg
anti-human (α) CEACAM8, FITC	6/40 c (Maus)	Bernhard B. Singer
anti-human (α) CD3, FITC	MEM-57 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD4, FITC	MEM-241 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD8, FITC	MEM-31 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD14, FITC	MEM-15 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD16, FITC	HI16a (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD19, FITC	LT19 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD25, FITC	MEM-181 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD69, FITC	FN50 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe

Anti-human CEACAM1 (B3) sowie anti-human CEACAM8 (6/40 c) wurden für die durchflusszytometrische Analyse als FITC-gekoppelte Varianten vom Institut zur Verfügung gestellt. Die Konjugation war mit Hilfe des *Pierce[®] FITC Antibody Labeling Kit* (Thermo, Langenselbold) erfolgt. Alle anderen Antikörper wurden als bereits FITC-gekoppelte Varianten von ImmunoTools bzw. Aldevron erworben.

2.1.9.2 Antikörper und Fc-Konstrukte für die T- und B-Zell-Proliferation

Antikörper/Fc-Konstrukte	Klon	Hersteller
anti-human (α) CD3 (no azide)	MEM-57 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD28 (no azide)	15E8 (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) CD40 (no azide)	HI40a (Maus)	ImmunoTools, Friesoythe
anti-human (α) IgM	MA2 (Maus)	Exbio, Prag, Tschechien
CEACAM8-Fc	6/40 c (Maus)	Bernhard B. Singer
Ko-Fc (CEACAM1dN-Fc)		Bernhard B. Singer
Maus IgG Kontrolle		ImmunoTools, Friesoythe

2.1.9.3 Antikörper zur Proteindetektion im Western Blot

Antikörper	Klon	Hersteller
Anti-human (α) CEACAM1/CEACAM5	4/3/17 (Maus)	Bernhard B. Singer
anti-human (α) CEACAM6	13H10 (Maus)	Aldevron, Freiburg
anti- β -Aktin, HRP-konjugiert	AC-15 (Maus)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Peroxidase AffiniPure Ziege anti-Maus IgG, F(ab') ₂ Fragment		Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England

2.1.10 Zellen und Medium

Alle Untersuchungen wurden mit frisch isolierten naiven PMN (*polymorphonuclear neutrophils*) und PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) gesunder Probanden durchgeführt. Nach Aufklärung und Einholen der mündlichen und schriftlichen Zustimmung wurde allen Probanden 40 ml Blut nach gängiger Venenpunktionstechnik abgenommen. In einem weiteren Schritt wurde das Blut per Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Das Probandenkollektiv setzte sich aus 14 gesunden Probanden zusammen, 5 weiblich, 9 männlich, im Alter von 23-63 Jahren.

Zellmedium:

- 10% FCS (hitzeinaktiviert) (v/v)
- 100 U/ml Penicillin
- 100 μ g/ml Streptomycin
- 2 mM L-Glutamin
- In DMEM

2.1.11 Geräte

Digitalkamera ProgRes™ C10 ^{plus}	Jenoptik, Jena
Elektrophorese Kammer	Bio Rad, Richmond, USA
Elektrophorese System <i>Mini Trans-Blot</i> ®	Bio Rad, Richmond, USA
ELISA-Reader Sunrise	TECAN, Männedorf, Schweiz
FACS Calibur	BD, Heidelberg
Fotometer	Eppendorf, Hamburg
Geldokumentationssystem LAS 3000 mini	FujiFilm, Düsseldorf
Gel Imager UV-System	Intras, Göttingen
Inkubator HERA Cell 150	Thermo, Langenselbold
Mikroliter Spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Mikroskop Leica DM II	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim
PCR-Thermocycler	Bio Rad, Richmond, USA
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
PowerPack Universal Netzteil	Bio Rad, Richmond, USA
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank	NuAire, Plymouth, USA
Thermoblock	Grant, Hillsborough, USA
Ultraschall-Gerät Sonopuls HD 270	Bandelin, Berlin
Vortex VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Zeiss Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Zentrifugen	
Mikro 200 R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 38 R	Hettich, Tuttlingen
Sprout® Mini-Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf

2.1.12 Software

CellQuest Pro	BD, Heidelberg
Geldokumentationssystem Intas Software	Intas, Göttingen
Image Reader LAS 3000 mini Software	FujiFilm, Düsseldorf
Multi Gauge	FujiFilm, Düsseldorf
PASW Statistiks 18	IBM SPSS, Ehningen
ProgRes™ CapturePro 2.5	Jenoptik, Jena

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolation peripherer Blutzellen

Granulozyten (PMN) und Lymphozyten (PBMCs) wurden aus heparinisierten Blutproben (16 I.E./ml) gesunder Probanden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Bei diesem Verfahren wird die unterschiedliche Dichte der Blutzellpopulationen ausgenutzt. Während mononukleäre Zellen (PBMCs) die gleiche Dichte wie die Trennlösung (Ficoll) aufweisen, wandern die schwereren PMN während der Zentrifugation entlang des Dichtegradienten durch die Trennlösung bis auf den Boden des Röhrchens.

Es wurden 40 ml Vollblut in bereits Heparin enthaltende Monovetten abgenommen und unter sterilen Bedingungen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Alle folgenden Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt und die Medien vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Dem Blut wurde 1 ml 6% Dextransulfat-Lösung (AppliChem), in DMEM (Gibco) gelöst, zugegeben. Als komplexes Polysaccharid vernetzt Dextransulfat die Erythrozyten über ihre Zuckeroberfläche und führt somit zu ihrer effizienteren Sedimentierung. Nach Zugabe von 5 ml 1 x PBS (Seromed) wurde das Zentrifugenröhrchen leicht geschwenkt, die entstandenen Luftblasen mit einer Pipettenspitze zerstochen und bei Raumtemperatur für ca. 40 Minuten zum Sedimentieren stehen gelassen. Das Plasma wurde dann in ein neues 50 ml Röhrchen übertragen und bei 710 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zum Pelletieren der Leukozyten zentrifugiert (Rotina 38R, Hettich). Danach wurde das überstehende Plasma abgenommen und 5 ml für die später folgende Monozytenentfernung (2.2.1.2) verwahrt. Das verbliebene Zellpellet

wurde in 20 ml DMEM (Gibco) resuspendiert. 15 ml auf Raumtemperatur erwärmtes Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare) wurde vorsichtig, Tropfen für Tropfen, mit der Zellsuspension überschichtet und bei 1300 x g für 35 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Entlang des Dichtegradienten entstanden so zwei Zellfraktionen (Abb. 6): Auf dem Boden des Röhrchens ein Zellpellet, bestehend aus PMN und verbliebenen Erythrozyten, sowie ein der Ficoll-Phase aufliegender PBMC-Ring. Dieser setzte sich zusammen aus T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Dendritischen Zellen sowie Natürlichen Killerzellen.

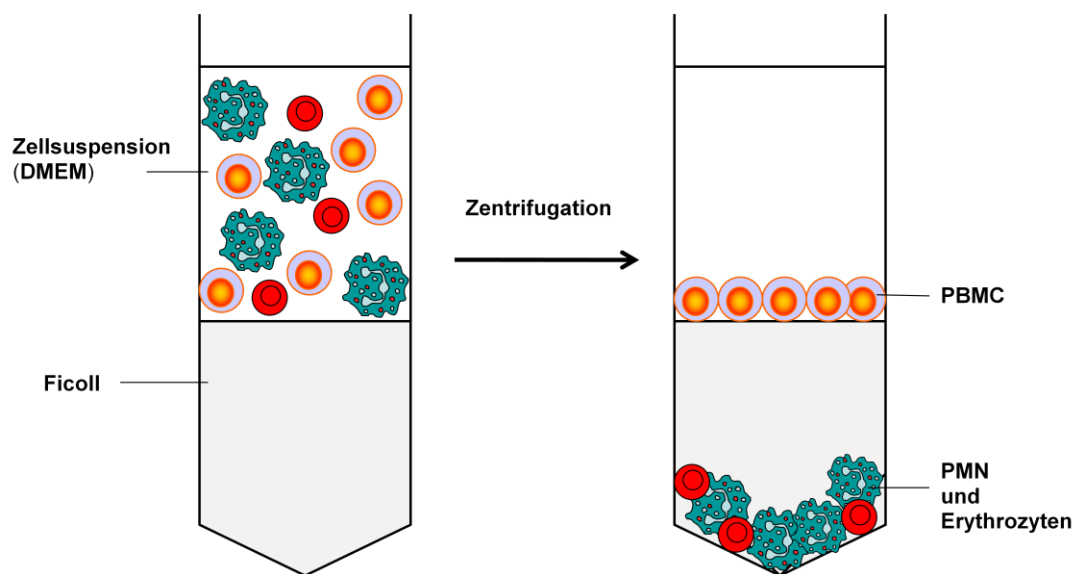


Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation zur Separation von PBMCs und PMN. Heparinisiertes Vollblut gesunder Probanden wurde zunächst sedimentiert und die Leukozyten aus dem Überstand gewonnen (nicht dargestellt). In DMEM resuspendiert, wurden diese über Ficoll geschichtet und der Ansatz bei 1300 x g für 35 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Das linke Bild zeigt den Ansatz vor Zentrifugation, das rechte Bild die beiden isolierten Zellfraktionen nach Zentrifugation.

Das überstehende DMEM (Gibco) wurde bis knapp über den PBMC-Ring abgesaugt, die PBMCs abpipettiert und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das verbliebene Ficoll (GE Healthcare) wurde ebenso abgesaugt und das Zellpellet am Boden des Röhrchens zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten in 2 ml sterilem Aqua dest. vorsichtig für 20 Sekunden resuspendiert. Durch den osmotischen Gradienten zwischen dem Zellinneren und destilliertem H₂O, kommt es zu einer Diffusion von Wasser in die Zelle und zum Zerplatzen der osmotisch instabileren Erythrozyten. Sowohl das Röhrchen mit der PMN- als auch der PBMC-Fraktion wurde zum Waschen bis auf 40 ml mit DMEM

aufgefüllt und dann bei 710 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Bei insuffizienter Lyse der Erythrozyten wurde der Osmoschock wie oben beschrieben wiederholt und erneut mit DMEM gewaschen.

Die PMN- und PBMC-Pellets wurden je in 2 ml Zellmedium resuspendiert. Der Erfolg der Isolation beider Fraktionen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Zellgröße und Granularität im Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) überprüft und die Subpopulationen mittels Antikörper detektiert (2.2.2.1).

2.2.1.2 Monozytenentfernung

Die PBMC-Fraktion besteht neben Lymphozyten auch aus ca. 10 % Monozyten (spenderabhängig). Da die BrdU-Proliferationsassays (2.2.2.3) mit nicht-monozytenfreien PBMCs zu inhomogenen Ergebnissen führten (3.4), sollte versucht werden, die Komplexität des Testsystems durch Monozytenentfernung zu minimieren. Dazu wurde eine Zellkulturschale (96 x 21 mm) mit 5 ml DMEM (Gibco) gefüllt und für 30 Minuten im Brutschrank bei 5 % CO₂, 37°C und einer Feuchtigkeit von 95 % vorinkubiert. Die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltene PBMC-Fraktion wurde in 10 ml DMEM, versetzt mit 5 ml autologem Plasma, suspendiert. Das Plasma wurde zuvor aus dem Überstand nach Erythrozytensedimentation und Pelletieren der Leukozyten gewonnen (2.2.1.1). Nach Absaugen der 5 ml DMEM aus der Zellkulturschale, wurde die PBMC-Suspension in diese überführt und für 2-4 Stunden unter obigen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

Monozyten bilden in den ersten Stunden der Kultivierung kleine Ausläufer und adhäreren am Boden der Schale. Obwohl auch andere PBMCs adhäreren können, ist die Adhäsion nicht so stark wie bei den Monozyten und der Großteil der Lymphozyten kann relativ leicht durch Waschen gelöst werden. Die Adhäsion der Monozyten wurde unter leichtem Schwänken der Zellkulturschale lichtmikroskopisch überprüft. Konnte keine ausreichende Adhäsion beobachtet werden, wurde die Inkubation für eine weitere Stunde fortgesetzt und der Adhäsionsgrad erneut überprüft. Der Lymphozyten enthaltende Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die verbleibende Monozytenschicht wurde mit 5 ml 1 x PBS (Seromed) durch Schwenken vorsichtig gewaschen und der Überstand zu der monozytenfreien Lymphozytensuspension überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um so den Verlust an Lymphozyten

weitmöglichst zu minimieren. Die so erhaltenen Lymphozyten wurden bei 710 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert und in 2 ml DMEM resuspendiert. Das hier gewählte Verfahren der Monozytenisolation durch Adhäsion (Bennett und Breit, 1994) stellt eine kostengünstige Alternative zu anderen Isolationsmethoden wie Immun-Selektion, Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) oder Dichtegradientenzentrifugation dar. Da die Reinheit der Monozytenfraktion in dieser Arbeit keine Rolle spielte, war dieses Verfahren für die hier behandelten Fragestellungen ausreichend.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Assistent) wurde die Zellzahl bestimmt. Zunächst wurden 10 µl der erhaltenen Zellsuspensionen 1:100 mit DMEM verdünnt. Ein Deckglas wurde leicht angefeuchtet und auf die Zählkammer gelegt. Das Erscheinen von Newtonschen Ringen zeigte an, dass das Deckglas richtig angebracht wurde und die Tiefe der Kammer richtig eingestellt war. Durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer wurden 10 µl der verdünnten Suspension in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden 4 große Quadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Nach der folgenden Formel konnte dann die Zellzahl pro ml berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 100 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Kammerfaktor})$$

2.2.1.4 Zellstimulation und Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank (Hera Cell 150, Thermo).

Ein Teil der monozytenfreien und nicht-monozytenfreien frisch isolierten PBMCs wurde direkt für die Proliferationsassays verwendet (2.2.2.3), während der andere Teil zunächst mit verschiedenen Agenzien stimuliert wurde. Hierzu wurden in einer 48-Multiwell-Platte (TPP) jeweils 100.000 Zellen pro Well in 200 µl Zellmedium einschließlich des Stimulus kultiviert. Verwendet wurden die unter 2.1.8 aufgelisteten Stimuli in ihrer jeweiligen Endkonzentration. Anti (α)-CD3 und αCD28 wurden in Kombination eingesetzt. Als

Negativkontrollen wurden Lymphozyten in reinem Zellmedium mit angesetzt. Die Inkubation erfolgte unter oben genannten Standardbedingungen. Die CEACAM1- und CEACAM6-Expression (2.2.2.1) sowie die Anzahl an toten Zellen (2.2.2.2) wurde jeweils an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 7 und 11 im Durchflusszytometer bestimmt.

Nach Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen (3.3) wurden die PBMCs nur noch selektiv mit denjenigen Agenzien inkubiert, die zu einem signifikanten Anstieg der CEACAM1- und CEACAM6-Expression führten, um die so stimulierten Zellen dann für weitere Analyseschritte zu verwenden. Auf Grund der inhomogenen Ergebnisse des BrdU-Proliferationsassays mit nicht-monozytenfreien PBMCs (3.4) wurden zur Vereinfachung nur noch monozytenfreie Zellen für weitere Stimulationsansätze verwendet. Dazu wurde eine 6-Multiwell-Platte (TPP) verwendet, in jedes Well 15×10^6 Zellen transferiert und in 2 ml Zellmedium inkubiert. Die ausgewählten Agenzien waren IL2, IL7, und α CD3/ α CD28. Diese wurden in den unter 2.1.8 genannten Konzentrationen eingesetzt. Nach viertägiger Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen geerntet, da sie gemäß der Zytokin-Kinetik an diesem Tag die stärkste CEACAM1- und CEACAM6-Expression aufwiesen (3.3). Da jede Stimulation mit einem aktivierungsinduzierten Zelltod einhergehen kann, wurden die lebenden Zellen durch erneutes Überschichten der Zellsuspension auf Ficoll und Zentrifugation bei $1300 \times g$ für 20 Minuten bei Raumtemperatur isoliert. Da apoptotische Zellen schrumpfen und somit an Dichte zunehmen, sind sie leicht durch einen Dichtegradienten von den lebenden Zellen zu trennen. Der PBMC-Ring mit den lebenden Zellen wurde abgenommen, dreimal in 5 ml $1 \times$ PBS gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert. Die so aufgereinigten Zellen oder deren Lysate (2.2.3.1) wurden für die folgenden weiteren Versuche verwendet:

1. Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungszustandes (2.2.2.1)
2. BrdU-Proliferationsassay (2.2.2.3)
3. Proteinbiochemische Untersuchung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.2.3)
4. Molekularbiologische Untersuchung mittels RNA-Isolierung und RT-PCR (2.2.4)

2.2.2 Immunologische Methoden

2.2.2.1 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension, basierend auf ihren Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Beide Parameter können hier, im Gegensatz zur einfachen Fluoreszenzmikroskopie, zeitgleich gemessen werden. Dazu wird die zu analysierende Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in eine Messküvette gepresst und so hydrodynamisch fokussiert, dass die Zellen sequentiell einen Laserstrahl ($\lambda = 450 \text{ nm}$) passieren und das eintreffende Licht gestreut wird. Der Großteil des Lichtes wird in Vorwärtsrichtung (FSC, *forward scatter*) gestreut und ist ein Maß für die Zellgröße. In Abhängigkeit von der Granularität wird der einfallende Lichtstrahl im rechten Winkel zu seiner Hauptstrahlrichtung gestreut (SSC, *side scatter*). Anhand der korrelierten Darstellung von FSC und SSC ergibt sich ein für jede Zelle typisches Streulichtmuster, das ermöglicht, unterschiedliche Populationen einer Zellsuspension zu klassifizieren. Durch den Laserstrahl werden des Weiteren die Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Lichtquanten angeregt. Da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu der Anzahl der vorhandenen Antikörper-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche ist, lassen sich hiermit zusätzlich zu den qualitativen Informationen auch quantitative Aussagen über die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle der untersuchten Zellpopulation treffen. Mit Hilfe der Software CellQuest Pro (BD) wurden die so erhaltenen Daten sowohl in der Einparameterdarstellung (Histogramm), als auch in der Zweiparameterdarstellung (*Dot Plot*) ausgewertet.

Auf Grund ihrer intrazellulären Granula lassen sich PMN ins Besondere durch Verwendung des SSC von den nicht-granulären PBMCs unterscheiden. Der Erfolg der Isolation (2.2.1.1) konnte somit direkt durchflusszytometrisch überprüft werden. Abbildung 7 zeigt ein repräsentatives Beispiel einer solchen Isolation. Hierfür wurden die zuvor isolierten Zellfraktionen zur besseren Veranschaulichung der unterschiedlichen Streulichtmuster nochmals zusammen resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

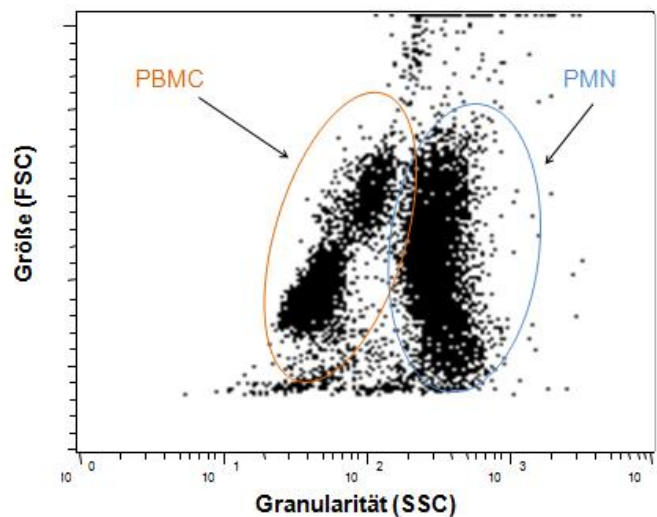


Abbildung 7: FACS-Analyse der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMC- und PMN-Fraktion. Die zuvor getrennten Populationen wurden zur besseren Veranschaulichung erneut miteinander resuspendiert. Die Charakterisierung erfolgte nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) in der Zweiparameterdarstellung im *Dot Plot*.

Zur Charakterisierung der Subpopulationen frisch isolierter PBMCs wurden die Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe zellspezifischer Antikörper analysiert. Verwendet wurden die unter 2.1.9.1 aufgeführten α CD3, α CD4, α CD8, α CD14, α CD16 und α CD19. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC-Fraktion der physiologischen Verteilung der Subpopulationen *in vivo* entspricht. Die durchflusszytometrische Untersuchung der PBMC-Subpopulationen erfolgte direkt nach Isolierung (Tag 0). Des Weiteren wurde die CEACAM1- und CEACAM6-Expression der stimulierten Zellen jeweils an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 7 und 11 analysiert. Außerdem erfolgten punktuelle Analysen an bis zu 8 ausgewählten Messzeitpunkten. Gleichzeitig wurden die toten Zellen mit Hilfe des Interkalators Propidiumjodid (Sigma-Aldrich) ermittelt (2.2.2.2). Der Aktivierungszustand an Tag 4 der Zytokin-Stimulation wurde mittels Antikörper sowohl gegen den bekannten frühen Leukozytenaktivierungsmarker CD69 als auch den Spätmarker CD25 gemessen (2.1.9.1). CD69 wird innerhalb von 30-60 Minuten nach einer Aktivierung exprimiert und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivierung (Testi et al., 1994). Als α -Kette des IL-2 Rezeptors wird CD25 erst nach 1-2 Tagen auf aktivierten Lymphozyten exprimiert (Brusko et al., 2009).

Für alle oben genannten Untersuchungen wurden ca. 100.000 Zellen je Ansatz in ein Rundboden-Röhrchen überführt und fluoreszenzmarkiert. In Abhängigkeit von den zu Verfügung stehenden Antikörpern unterscheidet man die direkte von der indirekten Fluoreszenzmarkierung (Abb. 8). Bei der direkten Fluoreszenzmarkierung ist der Detektionsantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff, in dieser Arbeit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), konjugiert. FITC emittiert nach Anregung Licht der Wellenlänge 520-530 nm. Bei der indirekten Fluoreszenzmarkierung wird zuerst der antigenspezifische Primärantikörper mit den Zellen inkubiert. In einem zweiten Schritt wird ein mit FITC-gekoppelter Sekundärantikörper, der sich gegen die Spezies des ersten Ak richtet, aufgetragen. Über die Bindung an den Primärantikörper weist dieser somit indirekt das zu detektierende Antigen nach. Aus praktischen Gründen wurden für diese Arbeit direkt FITC-gekoppelte Ak verwendet. Die Zellen wurden mit den unter 2.1.9.1 aufgeführten Detektionsantikörpern (5 µg/ml) in 50 µl FACS-Puffer (PBS mit 3% FCS) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Um unspezifische Fluoreszenz und Autofluoreszenz der Zellen abzugrenzen wurden ungefärbte Kontrollzellen mitgeführt.

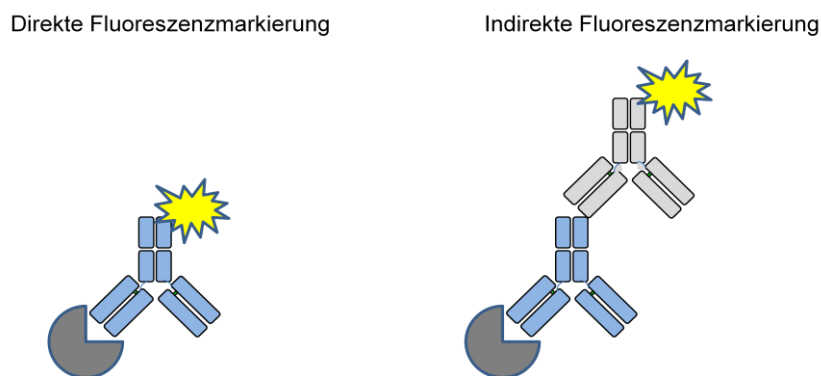


Abbildung 8: Direkte und indirekte Fluoreszenzmarkierung im Vergleich. Während bei der direkten Fluoreszenzmarkierung bereits der Primärantikörper mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, wird für die indirekte Fluoreszenzmarkierung ein konjugierter Zweitantikörper benötigt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 300 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 250 x g für 3 Minuten bei 10 °C pelletiert. Zwischen jedem Schritt wurde der Puffer durch schnelles Auskippen der Rundboden-Röhrchen und Abtupfen auf Filterpapier entfernt. Die gewaschenen Zellpellets wurden in 100 µl eisgekühltem FACS-Puffer mit

zugesetztem Propidiumjodid (5 µg/ml) resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS Calibur, BD) mit Hilfe der Software CellQuest Pro (BD) analysiert. Die toten Zellen wurden bei der Analyse ausgeschlossen.

2.2.2.2 Detektion der toten Zellen

Da jede Zellstimulation auch mit einem vermehrten Zelluntergang einhergehen kann, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Anzahl an toten Zellen gemessen. So konnten zum einen die toten Zellen aus den durchflusszytometrischen Messungen ausgeschlossen werden und zum anderen das Ausmaß des aktivierungsinduzierten Zelltods durch die einzelnen Stimuli verglichen werden. Dazu wurden die Zellen vor der Analyse im Durchflusszytometer mit Propidiumjodid (PJ) (5 µg/ml) in FACS-Puffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Da nur in toten Zellen die Integrität der Plasmamembran verloren geht, wird PJ selektiv in diese Zellen aufgenommen, während es die intakte Membran lebender Zellen nicht überwinden kann. Als Interkalator bindet PJ an die zelluläre DNA und emittiert nach Anregung rotes Licht mit einem Emissionsmaximum von 617 nm. Somit stellt PJ einen typischen Marker zur Detektion toter, nekrotischer Zellen im Durchflusszytometer dar. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software.

2.2.2.3 BrdU-Proliferationsassay

Eine Methode um die Zellproliferation zu messen, besteht in dem Monitoring der DNA-Synthese. Traditionell wird der Einbau des radioaktiven [³H]-Thymidin als direktes Maß der DNA-Synthese verwendet. Hierbei stellt der Umgang mit Radioisotopen und deren Entsorgung einen deutlich limitierenden Faktor dar. Als kalorimetrische Alternative wurde in dieser Arbeit der BrdU-Assay (*Cell Proliferation Biotrack ELISA-System*, Amersham, GE Healthcare) verwendet. Hierbei wird 5-Bromo-2'-desoxy-uridin (BrdU) als chemisches Nukleosid-Analogon zu Thymidin an dessen Stelle in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. In einem weiteren Schritt wird BrdU durch Peroxidase-konjugiertes anti-BrdU gebunden und anschließend die Peroxidase-bedingte TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratumsetzung bei 450 nm spektrometrisch gemessen. Die Menge an detektiertem, eingebautem BrdU ist proportional zur DNA-Synthese und somit proportional zur Anzahl proliferierender Zellen. Fokus dieser Versuchsreihe war der Einfluss von löslichem

CEACAM8 auf das Proliferationsverhalten von B- und T-Zellen. Die Ansätze erfolgten in 96-Multiwell-Platten (TPP) immer als Triplikate.

Die T-Zell-Stimulation wurde mit verschiedenen Zellpopulationen durchgeführt: Frisch isolierte monozytenfreie und nicht-monozytenfreie PBMCs, vier Tage mit IL2 und α CD3/ α CD28 stimulierte PBMCs einschließlich der ebenfalls für vier Tage inkubierten unstimulierten Negativkontrolle. Dazu wurden jeweils 30.000 Zellen pro Well in 100 μ l Zellmedium unter Standardbedingungen kultiviert und mit den in Tabelle 1 aufgelisteten Antikörperkombinationen und Fc-Konstrukten in ihrer jeweiligen Endkonzentration stimuliert (siehe auch 2.1.9.2). Als nicht CEACAM1-bindende Kontrolle diente CEACAM1dN-Fc (Ko-Fc), ein CEACAM1-Fc Konstrukt, dem die spezifische N-Bindungsdomäne fehlt. Zur Stimulation des TZR-Komplexes wurden CD3-Ak gewählt, welche sich gegen eine Untereinheit des Rezeptors richten.

Tabelle 1: T-Zell-Stimulation: Antikörper/Fc-Konstrukte und ihre jeweilige Endkonzentration

Antikörper und Fc-Konstrukte	Endkonzentration
α CD3	0,5 μ g/ml
α CD28	1,5 μ g/ml
CEACAM8-Fc	5 μ g/ml
Ko-Fc	5 μ g/ml
α CD3/ α CD28	0,5 μ g/ml/ 1,5 μ g/ml
α CD3/ CEACAM8-Fc	0,5 μ g/ml/ 5 μ g/ml
α CD3/ Ko-Fc	0,5 μ g/ml/ 5 μ g/ml

Die B-Zell-Stimulation erfolgte sowohl mit naiven monozytenfreien und nicht-monozytenfreien PBMCs, als auch mit für vier Tage IL2-stimulierten PBMCs, einschließlich der Negativkontrolle. Auf Grund der anteilig kleinen Menge der B-Zellen an der PBMC-Fraktion, wurden pro Well 90.000 Zellen in 100 μ l Zellmedium unter Standardbedingungen kultiviert und mit den in Tabelle 2 angegebenen Antikörperkombinationen und Fc-Konstrukten in ihrer jeweiligen Endkonzentration stimuliert (siehe auch 2.1.9.2). Als Kontrolle diente auch hier Ko-Fc. Da alle naiven B-Zellen auf ihrer Oberfläche IgM exprimieren, wurde zur Stimulation des BZR-Komplexes

quervernetzendes anti-human IgM verwendet, welches die Antigen-Bindung an den BZR simulierte.

Tabelle 2: B-Zell-Stimulation: Antikörper/Fc-Konstrukte und ihre jeweilige Endkonzentration

Antikörper und Fc-Konstrukte	Endkonzentration
α IgM	0,8 μ g/ml
α CD40	2 μ g/ml
CEACAM8-Fc	5 μ g/ml
Ko-Fc	5 μ g/ml
α IgM/ α CD40	0,8 μ g/ml/ 2 μ g/ml
α IgM/ CEACAM8-Fc	0,8 μ g/ml/ 5 μ g/ml
α IgM/ Ko-Fc	0,8 μ g/ml/ 5 μ g/ml

Um zu untersuchen, ob die CEACAM8-vermittelten Effekte auch eindeutig auf die spezifische Bindung seiner N-Domäne an oberflächengebundenes CEACAM1 zurückzuführen sind, wurde die N-Bindungsdomäne des CEACAM8 für einen separaten Versuch blockiert. Dazu wurde lösliches CEACAM8-Fc zunächst mit einem CEACAM8-Ak (6/40c) inkubiert, der spezifisch die N-Domäne bindet. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass Antigen und Blockierungs-Ak jeweils im Verhältnis 1:2 vorlagen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde unter Standardbedingungen im Inkubator. Danach wurden monozytenfreie PBMCs mit 5 μ g/ml der CEACAM8-Fc/anti-CEACAM8-Komplexe in Kombination mit 0,8 μ g/ml α IgM inkubiert. Als Kontrolle wurde, wie oben beschrieben, 5 μ g/ml des ungeblockten CEACAM8-Fc mit α IgM kombiniert. Als Isotypkontrolle für den Blockierungsantikörper wurde Maus IgG mitgeführt.

Für den Leerwert wurde in allen Proliferationsassays ausschließlich Zellmedium verwendet. Als Negativkontrollen wurden nur in Zellmedium kultivierte Zellen mitgeführt. Am dritten Tag der Stimulation wurde das Medium mit 1% *BrdU labelling-Solution* versetzt und alle weiteren Schritte am vierten Tag gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen mit Peroxidase-konjugiertem anti-BrdU und Zugabe des TMB (Tetramethylbenzidin) wurde die TMB-Substratreaktion mit 20 μ l einer 1M Schwefelsäure (AppliChem) abgestoppt. Die Absorption wurde dann bei 450 nm im ELISA Reader (TECAN) gemessen.

2.2.3 Proteinbiochemische Analyse

Mittels der Polyacrylamidgelelektrophorese können Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Durch den Einsatz des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Puffern werden die Proteine denaturiert und entfaltet. Gleichzeitig wird deren Eigenladung überdeckt, sodass sie eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Somit wandern die Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung durch das Maschenwerk des Gels in Richtung Anode. Leichtere Moleküle wandern dabei schneller als die schweren. Die Proteinbanden können dann nach Transfer auf eine Membran durch spezifische Antikörper dargestellt werden. Um die CEACAM-Expression auf IL2-, IL7- und α CD3/ α CD28-aktivierten PBMCs zu untersuchen, wurden für diese Versuchsreihe Zell-Lysate an Tag 4 der Stimulation angefertigt. Als Kontrollen wurden ebenfalls Lysate frisch isolierter Zellen (Tag 0) und von Zellen mitgeführt, die für vier Tage ausschließlich in Zellmedium kultiviert worden waren. PMN-Lysate dienten als Positivkontrolle.

2.2.3.1 Zell-Lyse

3×10^6 Zellen der frisch isolierten sowie der nach Stimulation gewonnenen PBMCs (2.2.1.4) wurden in 100 μ l Lyse-Puffer (2.1.3), welchem ein Protease-Inhibitor Cocktail (Calbiochem) im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde, resuspendiert. Dann wurde die Suspension mit dem Vortexgerät homogenisiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um störende DNA-Schlieren im Western Blot zu vermeiden, wurden die Proben zur Zerstörung der DNA in einem nächsten Schritt mit Ultraschall (1 x 5 Zyklen, 30 W, 20 kHz) behandelt (Sonopuls, Bandelin). Danach wurden die Proben bei 15.000 x g für 10 Minuten bei 4°C zur Sedimentation von Zellorganellen zentrifugiert (Mikro 200 R, Hettich). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert oder direkt verwendet. Ebenso wurden auch PMN lysiert, die später als Positivkontrolle in der Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese mitgeführt wurden.

2.2.3.2 Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zum Auftrennen der Proteine wurde die Methode der Tricin-Gelelektrophorese angewendet. In dieser Technik ersetzt das Tricin das Glyzin im Laufpuffer, was in einer

besseren Laufeigenschaft der niedermolekularen Moleküle resultiert. Tricin-Ionen laufen vor den Proteinen her und verbessern somit die Auftrennung von kleinen Proteinen bei niedrigeren Acrylamid-Konzentrationen. In der Tat waren die Proteinbanden bei der Tricin-Gelelektrophorese akkurater getrennt als bei der initial zum Vergleich durchgeführten SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, sodass erstere in dieser Arbeit als Methode der Wahl angewendet wurde. Für die Tricin-Elektrophorese wurde ein 9%-iges Trenngel sowie ein 4%-iges Sammelgel nach dem in der Tabelle 3 aufgelisteten Protokoll hergestellt (Angaben jeweils für die Menge von zwei Gelen). Die Zusammensetzung des Tricin-Gelpuffers findet sich unter 2.1.3.

Tabelle 3: Bestandteile von Sammelgel und Trenngel

Bestandteile	Trenngel (9%)	Sammelgel (4%)
Glycerin	0,75 g	-
Wasser (deionisiert)	2 ml	3,8 ml
Tricin-Gelpuffer	2,5 ml	1,55 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2,25 ml	0,83 ml
APS 10% (w/v)	37,5 µl	50 µl
TEMED	3,75 µl	5 µl

Als Geldicke wurde 75 mm gewählt. Der Zwischenraum der beiden Glasplatten in der Haltevorrichtung (Bio Rad) wurde zuerst bis auf ca. 4,5 cm mit Trenngel gefüllt, danach wurde der verbleibende Raum direkt mit Sammelgel gefüllt und darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Um die Auftragstaschen zu bilden, wurde ein 10-er Kamm vorsichtig eingeführt. Nach 30 Minuten Polymerisation bei Raumtemperatur war das Gel bereit für den weiteren Gebrauch und der Kamm konnte vorsichtig entfernt werden. Die Gele wurden in die Elektrophoresekommer (Bio Rad) eingespannt (bei Verwendung nur eines Gels unter Gebrauch eines Gegenstücks), sodass ein dichter Hohlraum zwischen den beiden Glasträgern gebildet wurde. Dieser wurde randvoll mit Kathoden-Puffer (2.1.3) gefüllt. In einem nächsten Schritt wurden zuerst die Proben geladen. Dazu wurden die Zelllysate mit einem 5 x Lämmli-Puffer (2.1.3) 2:1 gemischt. Zur Reduktion der Schwefel-Brücken zwischen den Sulfhydrylgruppen des Cysteins innerhalb der Proteine wurde β -Mercaptoethanol (75 mM) (Sigma-Aldrich) zugefügt, alles gemischt und dann die Probe kurz herunterzentrifugiert. Die Lysate wurden dann für 10

Minuten bei 95 °C gekocht. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker *Page Ruler™ Plus prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet. Mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton) wurden zunächst 3 µl des Standards, dann 20 µl jeder Probe jeweils in eine Gel-Tasche geladen. Auf Grund der starken konstitutiven CEACAM-Expression durch Granulozyten wurden nur 5 µl des PMN-Lysates als Positivkontrolle aufgetragen. Die äußere Kammer wurde danach mit Anoden-Puffer (2.1.3) gefüllt. Die ersten 15 Minuten, bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel, wurde mit einer Spannung von 44 Volt gearbeitet. Danach wurden die Proben bei 100 Volt für 2-3 Stunden langsam laufen gelassen, bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront aus dem Gel herauslief.

2.2.3.3 Western Blot

Um die separierten Proteinfractionen weiter zu analysieren, wurden sie in einem elektrischen Feld von der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für das Bloten wurden sowohl Nitrozellulosemembranen (AppliChem) als auch Filterpapiere (Whatman) auf eine Größe von ca. 6 x 8 cm zugeschnitten. Auf die Anoden Seite der Blot-Kassette wurde zunächst ein Schwamm platziert, der vorher in Blot-Puffer (2.1.3) getränkt wurde, gefolgt von zwei Whatman-Filterpapieren und der Nitrozellulosemembran, ebenfalls in Blot-Puffer angefeuchtet. Das Gel wurde von den Glaträgern entfernt und vorsichtig auf die Nitrozellulosemembran gelegt, gefolgt von zwei angefeuchteten Filterpapieren und einem eingeweichten Schwamm. Um eventuell entstandene Luftblasen zu eliminieren, wurde ein 10 ml Röhrchen unter leichtem Druck über das Blotting-Set gerollt. Dieses wurde daraufhin in eine *Mini Trans-Blot®* Elektrophorese-Kammer (Bio Rad) eingespannt. Eine Eis-Kassette wurde ebenfalls an der Kathodenseite platziert um das Erhitzen der Membran während des Blotvorgangs zu unterbinden. Der Transfer erfolgte bei 100 Volt für 90 Minuten. Um die Qualität des Gels und des Blotvorgangs zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran nach Entfernen aus der Blot-Kassette unspezifisch und reversibel mit Ponceau-Rot Lösung (Sigma-Aldrich) gefärbt und unter Spülen mit deionisiertem Wasser entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich wurden. Danach wurde unter Durchlicht fotografiert und anschließend erneut gespült.

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern der folgenden Analyseschritte an die freie Oberfläche der Membran zu vermeiden, wurde die Membran in 3%-iger Milchlösung (Milchpulver in PBS) unter Schütteln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach konnte der Blot zur weiteren Analyse spezifischer Proteinbanden mittels entsprechender primärer Antikörper verwendet werden.

2.2.3.4 Detektion spezifischer Proteinfractionen

Die Nitrozellulosemembran wurde in einer 3%-igen Milch/PBS-Lösung des Primärantikörpers (3 µg/ml) über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Zur Detektion wurden die monoklonalen Antikörper Maus anti-CEACAM1 (4/3/17) und Maus anti-CEACAM6 (13H10) verwendet. Trotz der Kreuzreaktivität des CEACAM1-Antikörpers mit CEACAM5, konnte eine falsch hohe CEACAM1-Detektion in den untersuchten Lymphozyten ausgeschlossen werden, da CEACAM5 nur auf Epithelzellen exprimiert wird. Danach wurde die Membran drei Mal für 5 Minuten mit 1 x PBS auf dem Schüttler gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen. In einem nächsten Schritt wurde die Membran für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch) in einer Verdünnung von 1:5000 in 3%-iger Milch/PBS Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS konnte die Antikörperbindung durch Chemolumineszenzreaktion mit Hilfe des LAS 3000 Imager Systems (FujiFilm, Düsseldorf) detektiert werden. Die Reaktion beruht auf der oxidativen Freisetzung von Stickstoff aus Luminol durch Einwirkung von alkalischem Wasserstoffperoxid und wird durch die Peroxidase katalysiert. Dazu wurde der Blot zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und mit 1 ml der Entwicklerlösung (2.1.3) benetzt, welche durch auf- und abrollende Bewegungen der Folie gleichmäßig und blasenfrei über die Membran verteilt wurde. Mit Hilfe eines Phosphoreszenzstoffes wurden die Banden des Standards auf der Folie markiert, um sie für die Entwicklung sichtbar zu machen. Nach einer jeden Entwicklung wurde die Membran dreimal in 1 x PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen und konnte nun wie oben beschrieben mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden.

Zur groben Quantifizierung der Proteinbanden untereinander wurde der Blot zum Schluss mit HRP-konjugiertem anti β -Aktin Ak (Sigma-Aldrich) inkubiert, 1:1000 verdünnt in 3%-iger Milch/PBS Lösung. β -Aktin gehört zu den konstitutiv exprimierten Proteinen einer jeden Zelle. Die detektierbare Menge an β -Aktin ist somit ein Maß für die aufgetragene Gesamtproteinmenge. Nach 30-minütiger Inkubation und dreimaligem Waschen mit 1 x PBS wurde die Membran wie oben beschrieben entwickelt.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Zur weiteren Untersuchung der exprimierten CEACAM1-Isoformen und zum Nachweis von CEACAM6 auf translationaler Ebene wurde eine Reverse Transkriptase-PCR mit Primern durchgeführt, die spezifisch für CEACAM6 und die einzelnen Splice-Varianten des CEACAM1 sind. Zur Überprüfung einer möglichen Granulozytenkontamination wurde ebenso eine PCR mittels CEACAM8-spezifischer Primer durchgeführt.

2.2.4.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der proteinkodierenden *messenger* (m)-RNA aus den Zellen wurde das *RNeasy® mini Kit* (Qiagen) verwendet. Von den nach Stimulation gewaschenen PBMCs (2.2.1.4) sowie von den frisch isolierten monozytenfreien Zellen (2.2.1.2) wurde jeweils eine Fraktion von 3×10^6 Zellen in ein 1 ml Eppendorf-Tube überführt und bei $710 \times g$ bei 20°C für 3 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet dreimal mit 800 μl PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 350 μl RLT-Puffer (Bestandteil des Kits) mit Zusatz von 1% β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Durch diesen Schritt wurden die Zellen lysiert und die Ribonukleasen inaktiviert. Alle weiteren Schritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Durch selektives Binden an die *RNeasy®*-Säule wurde die RNA isoliert und Verunreinigungen durch Verwendung von Waschpuffer entfernt. Abschließend wurde die RNA mit 30 μl RNase-freiem Wasser von der Säule abgelöst. Um die Ausbeute an RNA zu erhöhen, wurde dieser Schritt wiederholt. Die isolierte RNA wurde entweder bei -80°C eingefroren oder direkt weiter verwendet.

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes der Probe wurde spektralphotometrisch die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen. Hierbei entspricht eine OD_{260} von 1 einer RNA Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zur RNA-Quantifizierung wurde ein Eppendorf Biofotometer verwendet, welches automatisch den RNA-Gehalt der Probe gemäß folgender Formel aus der gemessenen Absorption errechnet:

$$\text{RNA Konzentration } (\mu\text{g}/\text{ml}) = 40 \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der Proben wurde mit Hilfe des Absorptionsverhältnisses bei 260 nm und 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ermittelt. Eine Verunreinigung der RNA

durch Reste von Proteinen oder Ethanol konnte somit überprüft werden. Ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,8- 2,1 spricht für eine zufriedenstellende Reinheit der isolierten RNA.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Da eine direkte Amplifikation von RNA nicht möglich ist, wird diese zuerst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in eine komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese kann dann in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Abhängig vom RNA-Gehalt der Probe wurden 0,5 µg oder 1 µg an totaler RNA revers transkribiert. Dazu wurde das *QuantiTec® Reverse Transkriptase Kit* (Qiagen) verwendet. Die eingefrorenen RNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut und alle Reagenzien auf Raumtemperatur equilibriert. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die Reste an genomischer DNA wurden mittels des *gDNA Wipeout Puffers* eliminiert und die RNA durch Zugabe von RT und RT-Primern revers transkribiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 42 °C wurde die RT durch dreiminütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Die cDNA wurde in einem nächsten Schritt amplifiziert.

2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion angewendet. Hierbei wird ausgehend von einer Matrizen-DNA ein spezifisches Segment mit Hilfe eines dafür designten Primers identisch vervielfältigt. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide einschließlich ihrer *Annealing*-Temperatur und Lokalisation zeigt Kapitel 2.1.6. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Umschreibung der RNA in cDNA (2.2.4.2) wurde ein Ansatz mit Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-spezifischen Primern mitgeführt. Neben β-Aktin oder Cyclophilin wird auch GAPDH von jeder Zelle konstitutiv exprimiert und daher zu den sogenannten *Housekeeping*-Genen gezählt. GAPDH fungierte zusätzlich als Kontrollgen für die DNA-Beladung der Proben.

Auf molekularer Ebene erfolgt die PCR in drei Phasen, die sich zyklisch wiederholen: Die Denaturierung der DNA, die Primer-Anlagerung (*Annealing*) und die DNA-Synthese. Alle Reaktionsschritte wurden mit Hilfe eines Thermocyclers (Bio Rad) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die DNA bei 95 °C denaturiert. Im Anschluss wurde das Primer-Paar an die jeweilige komplementäre Sequenz der cDNA gebunden. Die *Annealing*-Temperatur

variierte dabei in Abhängigkeit von den verwendeten Primerpaaren zwischen 61-63°C (2.1.6). In einem nächsten Schritt wurde der DNA-Einzelstrang durch Anhängen der dNTPs (2-DesoxyRibonukleosid 5-triphosphat) in 3'→5' Richtung zu einem Doppelstrang vervollständigt. Die DNA-Synthese wurde durch eine hitzestabile Taq DNA-Polymerase katalysiert. Die so synthetisierten Doppelstränge wurden erneut in ihre komplementären Einzelstränge zerlegt und dienten für den zweiten Reaktionszyklus als Matrizen. Die Amplifikation wurde initiiert durch 3-minütiges Aufheizen auf 95 °C, gefolgt von insgesamt 34 Zyklen. Als Positivkontrolle wurden Plasmide verwendet, die die jeweilige CEACAM-Variante trugen. Eine Übersicht über die verwendeten Plasmide liefert Kapitel 2.1.7. Wasser diente als Negativkontrolle um mögliche Verunreinigungen der Proben durch genetisches Material auszuschließen. Für die Amplifikation wurden zu jeweils 2 µl der cDNA-Matrize 28µl eines Master-Mix hinzugefügt, dessen Komponenten in Tabelle 4 ersichtlich sind. Die eingesetzten Mengen gelten jeweils für nur einen Reaktionsansatz. Die Reaktionsbedingungen fasst Tabelle 5 zusammen. Bis zur weiteren Verwendung der Amplifikate erfolgte eine Kühlung bei 4 °C.

Tabelle 4: Komponenten und Mengenangaben für den PCR-Reaktionsansatz.

Komponenten	Menge der Probe
10 x MgCl ₂	3 µl
dNTP's (2 µmol/l)	0,6 µl
Primer antisense (0,5 µmol/l)	3 µl
Primer sense (0,5 µmol/l)	3 µl
Taq DNA Polymerase (0,2 U)	0,2 µl
Wasser	18,2 µl
Gesamtvolumen Master-Mix	28 µl

Tabelle 5: Temperatur und Dauer der einzelnen PCR-Zyklen

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	3 Minuten	95 °C
Amplifikation (34 Zyklen):		
Denaturierung	30 Sekunden	95 °C
Primer Anlagerung	20 Sekunden	61-36 °C
DNA-Synthese	30 Sekunden	72 °C

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die durch PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden zur weiteren Analyse auf ein 2 %-iges Agarosegel geladen. Gemäß ihrer negativen Ladung wandert die DNA im elektrischen Feld Richtung Anode, wobei ihre Länge bzw. Ladung ihre Laufgeschwindigkeit bestimmt. Pro Gel wurden 2 g Agarose (Biozym) in einen Kolben gegeben und mit 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Dazu wurde der 50 x TAE-Puffer (2.1.3) zunächst 1:50 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Zur Detektion der DNA wurde dem Puffer 10 µl *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) hinzugefügt. *SYBR® Safe Stain* stellt eine sichere Alternative zu dem klassischerweise verwendeten Interkalator Ethidiumbromid dar, mit deutlich geringerer Genotoxizität und vergleichbarer Sensitivität. Mit Anregungsmaxima von 280 nm und 502 nm können die so gefärbten DNA-Banden in einem standard UV-Transluminator detektiert werden. Das Emissionsmaximum liegt bei 530 nm. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Nach Entstehung einer homogenen Lösung wurde es unter kontinuierlichem Schwänken in einem Wasserbad bis auf ca. 50°C abgekühlt und dann in die Gelkammer gegossen. Zur Bildung der Gel-Taschen wurde ein 10-er Kamm eingesetzt. Unter lichtundurchlässiger Abdeckung wurde die Aushärtung abgewartet. Die zuvor amplifizierten PCR-Produkte (2.2.4.3) wurden mit je 6 µl des Bromphenolblau-haltigen Ladepuffers (2.1.3) versetzt und davon 20 µl auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde 6 µl *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in 1 x TAE-Puffer für ca. 35 Minuten durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Banden wurde mittels UV-Licht (Gel Immager UV-System, Intas) sichtbar gemacht.

2.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student's t-test durchgeführt. Hierzu wurde die Software PASW Statistiks 18 verwendet (2.1.12). Unterschiede wurden als signifikant angesehen bei einem p-Wert von $< 0,05$. Eine kurze Beratung vom Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Universität Duisburg-Essen wurde in Anspruch genommen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung des Testsystems

3.1.1 Zellausbeute

Das für die Fragestellung dieser Arbeit verwendete Testsystem bestand aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), isoliert aus peripherem Vollblut gesunder Probanden. Um diese Zellfraktion gezielt untersuchen zu können, wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation Erythrozyten, PMN und PBMCs voneinander getrennt. Die Zellausbeute pro 40 ml entnommenen Blutes betrug sowohl für die PBMC- als auch die PMN-Fraktion durchschnittlich 40×10^6 Zellen, also 1×10^6 Zellen/ml Vollblut. Trotz ordnungsgemäßer Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation ließ sich eine minimale Kontamination der PBMC-Fraktion mit PMN (2-5%) nicht völlig vermeiden.

3.1.2 Zusammensetzung der PBMCs

In dieser Arbeit wurde auf die weitere Separation von T- und B-Zellen zwecks des Erhalts einer Mischkultur, die dem *in vivo* System am ehesten entspricht, verzichtet. Für die nachfolgenden Untersuchungen war daher eine möglichst physiologische Zusammensetzung der frisch isolierten Zellfraktionen (Tag 0) von Bedeutung. Die im Durchflusszytometer ermittelten PBMC-Subpopulationen entsprachen anteilmäßig der auch in der weitläufigen Literatur beschriebenen Differenzialzytologie, mit interindividuellen Variationen von Proband zu Proband (Abb. 9): 66 % (44-79 %) T-Zellen (CD3+), unterteilt in 42 % (30-49 %) T-Helferzellen (CD4+) und 20 % (14-24 %) zytotoxische T-Zellen (CD8+), 8,4 % (6-12 %) B-Zellen (CD19+), 11,2 % (9-13 %) Monozyten (CD14+) und 5,2 % (5-7 %) NK-Zellen (CD16+). Die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltene PBMC-Population war in ihrer Zusammensetzung somit repräsentativ für ein physiologisches *in vivo* System. Nach Monozytenseparation mittels Adhäsion (2.2.1.2) betrug der Anteil dieser Subpopulation durchschnittlich noch 1,5% (1-3%).

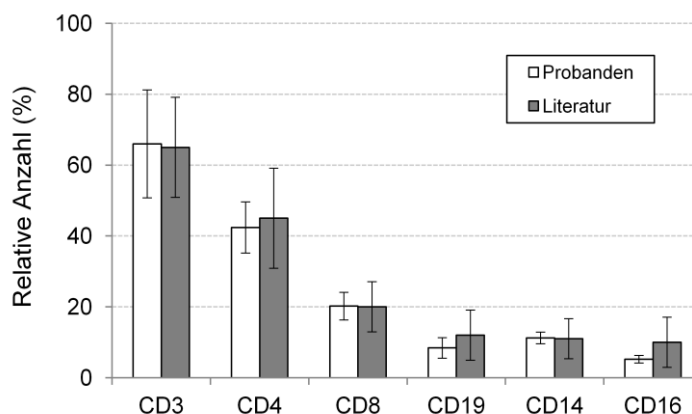


Abbildung 9: Relative Verteilung der PBMC-Subpopulationen (Tag 0). Die Detektion erfolgte durch phänotypische Charakterisierung im Durchflusszytometer mittels zellspezifischer Antikörper. Die weißen Balken zeigen die Mittelwerte von fünf repräsentativen Probanden \pm Standardabweichung, die grauen Balken repräsentieren die aus der Literatur bekannten Daten mit physiologischer Variation (nach Herold, Innere Medizin, 2009)

3.2. Qualitative Analyse der Zellstimulation durch IL2, IL7 und α CD3/ α CD28

Als Mediatoren der Zell-Zell-Kommunikation spielen Zytokine eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort. So können Entzündungszellen als Antwort auf stimulierende Agenzien die Expression ihrer Oberflächenrezeptoren modifizieren. Auch für CEACAM1 wurde eine aktivierungsinduzierte Hochregulation auf der Zelloberfläche von Lymphozyten beschrieben, insbesondere für IL2, IL7 und das T-Zell-spezifische Stimuluspaar α CD3/ α CD28 (Kammerer et al., 1998; Boulton und Gray-Owen, 2002; Gray-Owen und Blumberg, 2006). Neben der genaueren Untersuchung des CEACAM-Expressionsmusters (3.3) überprüften wir auch den allgemeinen Effekt der beschriebenen Stimuli auf den zellulären Aktivierungszustand frisch isolierter PBMCs. Dies geschah sowohl zellmorphologisch als auch mit Hilfe etablierter Leukozytenaktivierungsmarker. Lichtmikroskopisch zeigten die stimulierten Zellen gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle (Ko) eine vermehrte Bildung von Aggregaten sowie eine Zunahme der Zellgröße (Abb. 10). Während die Zytokine IL2 und IL7 ein ähnliches Bild präsentierten, zeichneten sich α CD3/ α CD28-stimulierte Zellen durch die Bildung besonders großer Aggregate aus. Durch Aktivierung treten Zellen miteinander in Interaktion und regulieren sich so gegenseitig. Aggregatbildung ist somit ein Charakteristikum der zellulären Aktivierung. Eine Veränderung der Zellgröße und -granularität konnte ebenso bei der

durchflusszytometrischen Analyse anhand des veränderten Streulichtmusters detektiert werden. Auch hier zeigten α CD3/ α CD28-stimulierte PBMCs ein anderes Bild als IL2- und IL7-stimulierte Zellen. Die unterschiedliche Morphologie und Größe der Aggregate sowie das unterschiedliche Streulichtmuster der Zellen in der Durchflusszytometrie weist auf einen qualitativen Unterschied der Zellstimulation durch antikörpervermittelte Aktivierung und IL2 bzw. IL7 hin.

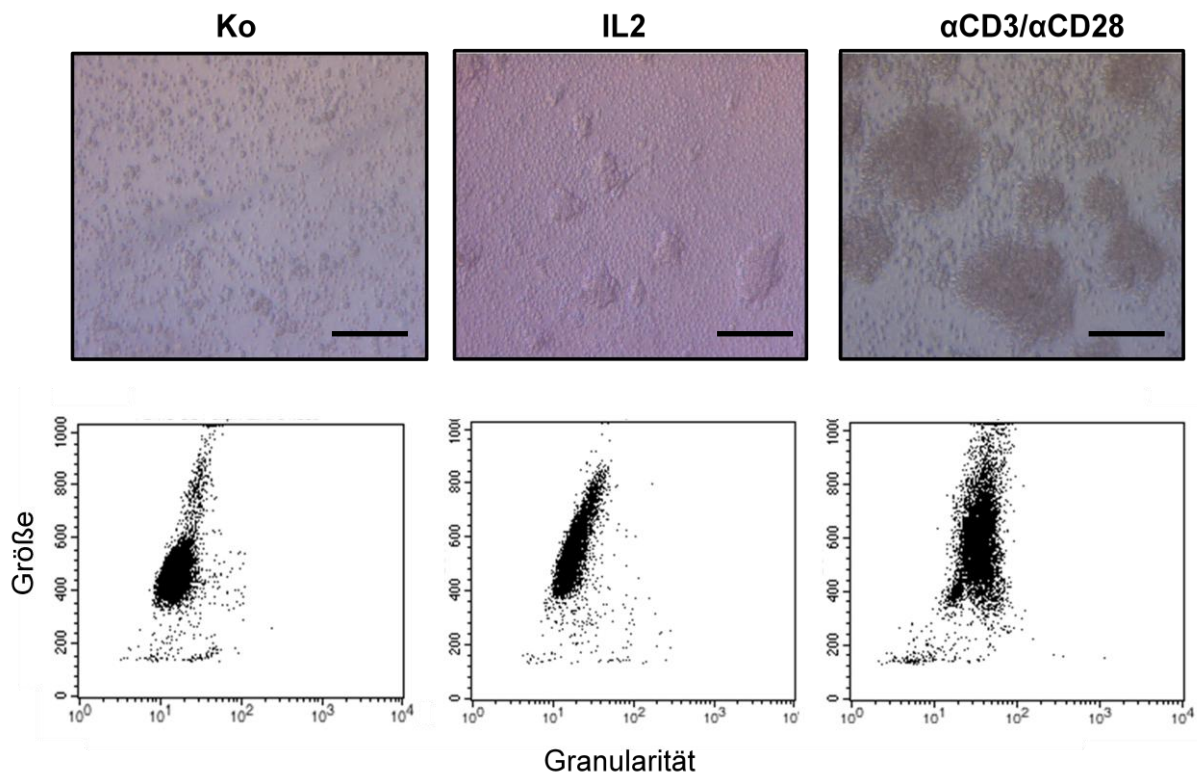


Abbildung 10: Zellmorphologische Veränderungen von PBMCs durch Stimulation. Die Zellen wurden an Tag 4 der Stimulation gewonnen und unter dem Lichtmikroskop fotografiert (oben). Balken = 250 μ m. Auch in der durchflusszytometrischen Messung zeigte sich eine Veränderung der Zellgröße und Granularität, dargestellt im *Dot-Plot*. IL2 ist stellvertretend für IL7 dargestellt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Untersuchungen fünf unterschiedlicher Probanden.

CD69 wird von Leukozyten umgehend nach ihrer Aktivierung exprimiert, während CD25 als später Aktivierungsmarker erst 1-2 Tage später auf der Zelloberfläche zu detektieren ist. IL2- und IL7- stimulierte PBMCs zeigten eine deutliche Erhöhung der CD69-Expression gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Tag 4), wohingegen nur eine geringe Zunahme des späten Aktivierungsmarkers CD25 zu beobachten war (Abb. 11). Die stärkste Induktion beider Oberflächenmoleküle zeigte allerdings die Stimulation mit

α CD3/ α CD28: Gegenüber den Kontrollzellen wies die CD69-Expression eine durchschnittliche Steigerung um das 5,4-fache auf, proportional zur gemessenen relativen Fluoreszenz. Die CD25-Expression zeigte eine deutliche Steigerung um das 11-fache. Es sei angemerkt, dass im *FACS-Overlay* (Abb. 11 A) Zellschrott jeweils als *Peak* am linken Rand der Fluoreszenzintensitäts-Skalen auftreten. Für Abb. 11 B wurden die relativen Fluoreszenzen als Mean aufgetragen, um so die breit gefächerten Fluoreszenzintensitäts-Kurven (Abb. 11 A) besser abzubilden.

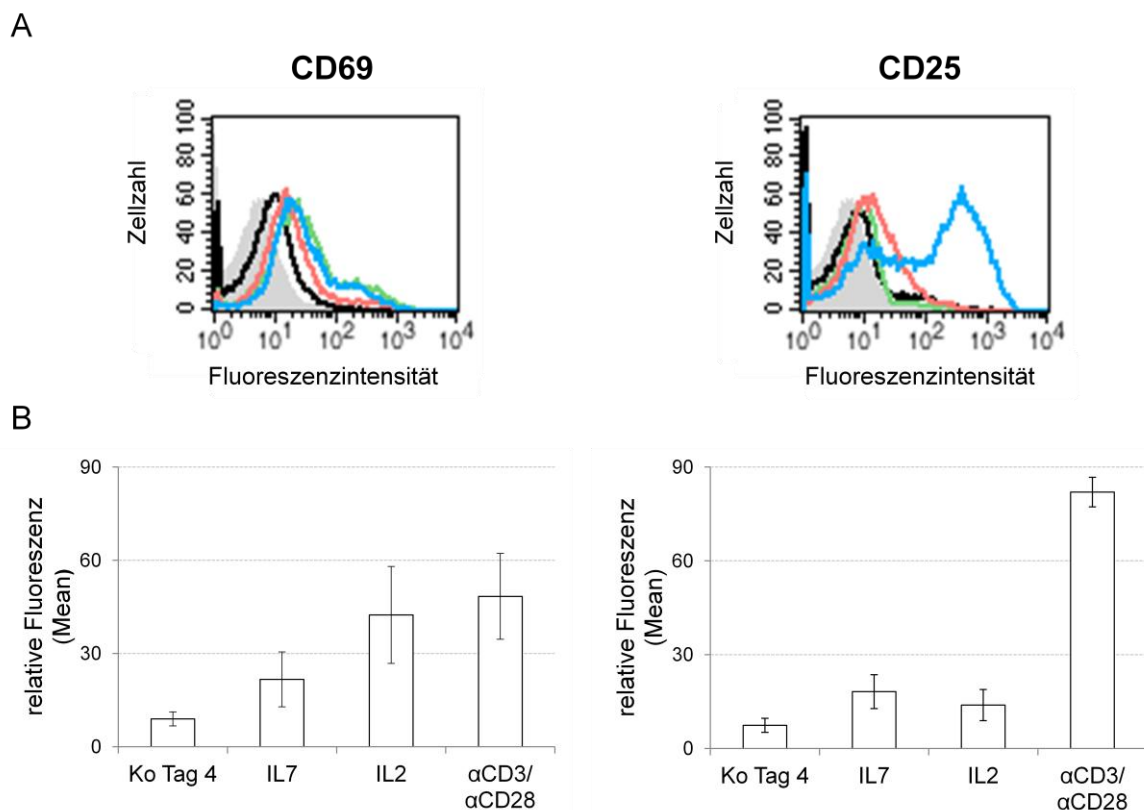


Abbildung 11: Vergleich des Aktivierungszustandes stimulierter PBMCs. Für 4 Tage mit IL7, IL2 und α CD3/ α CD28 stimulierte PBMCs wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich der Expression ihrer Leukozytenaktivierungsmarker CD69 und CD25 direkt mittels FITC-gekoppelter Antikörper analysiert. Die Ko zeigt die für 4 Tage ausschließlich in Zellmedium kultivierten Zellen. (A) Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten im *FACS-Overlay*, repräsentativ für vier unterschiedliche Untersuchungen (grau, Hintergrundfluoreszenz; schwarz, Kontrolle Tag 4; grün, IL2; rot, IL7; blau, α CD3/ α CD28). (B) Die Mittelwerte (Mean) \pm Standardabweichung der relativen Fluoreszenzen sind im Balkendiagramm für vier Probanden dargestellt ($n = 4$).

Gegenüber der Hintergrundfluoreszenz der nicht gefärbten Kontrolle wiesen auch die CD69-gefärbten Tag 4 Kontrollzellen eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität auf

(Abb. 11 A, links oben). Zellstimulation geht oftmals mit einem verstärkten aktivierungsinduzierten Zelltod einher. An Tag 4 der Stimulation wiesen die unstimulierten Kontrollzellen und die mit IL2 bzw. IL7 stimulierten PBMCs eine Überlebensrate von ca. 80 % auf. Hingegen überlebten nach α CD3/ α CD28-Stimulation durchschnittlich 25 % weniger Zellen (Abb. 12 A). Eine Inkubation mit IL2 bzw. IL7 führte des Weiteren zu keiner wesentlichen Veränderung des Anteils von T- (CD3+) und B-Zellen (CD19+) an der Gesamtpopulation (Abb. 12 B), verglichen mit den Daten frisch isolierter PBMCs (Abb. 9). Eine Aktivierung mit dem T-Zell-spezifischen Stimuluspaar α CD3/ α CD28 resultierte jedoch in einer durchschnittlich 97 % reinen T-Zell-Population. In Abbildung 12 ist auf Grund vergleichbarer Daten für IL7 und IL2 nur letzteres als Vertreter der Zytokine dargestellt. In der Gesamtheit bestätigen die in Abbildung 11 und 12 dargestellten Daten also eine unterschiedliche Qualität der Zellstimulation über CD3/CD28 im Vergleich zu den verwendeten Zytokinen.

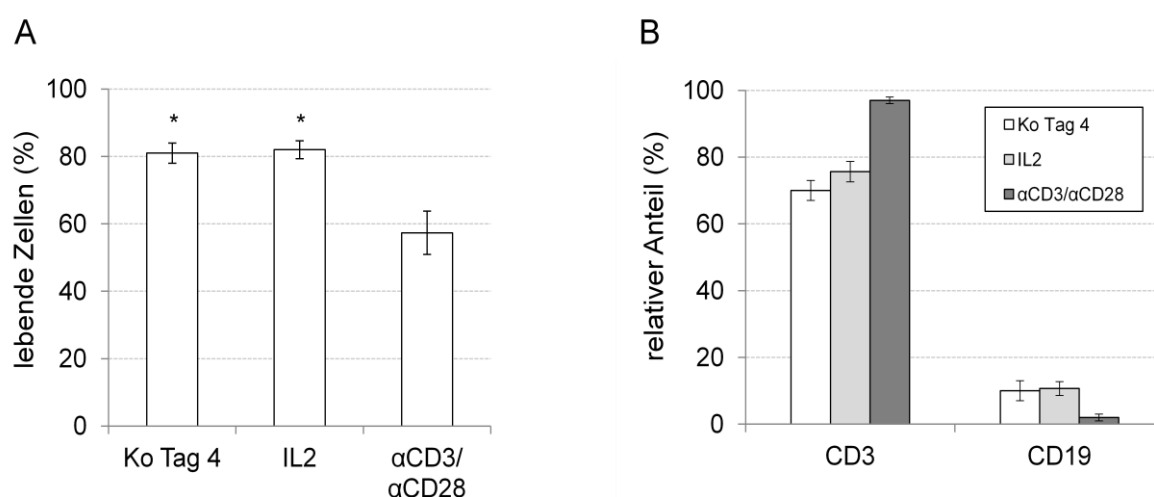


Abbildung 12: Überlebensraten und Verteilung der PBMC-Subpopulationen nach Stimulation. Für 4 Tage mit IL2 und α CD3/ α CD28 stimulierte PBMCs wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Überlebensrate und der Veränderungen in der Verteilung der Subpopulationen miteinander verglichen. Die Ko zeigt die für 4 Tage ausschließlich in Zellmedium kultivierten Zellen. (A) Mittelwerte \pm Standardabweichung der überlebenden Zellen (%), indirekt ermittelt durch die Detektion PJ-positiver toter Zellen in der Durchflusszytometrie, für drei repräsentative Untersuchungen. Ko und IL2-stimulierte Zellen verglichen mit α CD3/ α CD28 inkubierten Zellen ($n = 3$ *, $p < 0,05$). (B) Bestimmung des Anteils von T- (CD3+) und B-Zellen (CD19+) an der PBMC-Gesamtpopulation mittels spezifischer Antikörperfärbung. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige Untersuchungen verschiedener Probanden unter Ausschluss der toten Zellen.

3.3 CEACAM-Expressionsmuster in aktivierten und naiven PBMCs

Die funktionellen Assays zur CEACAM1-Funktion auf stimulierten Lymphozyten (3.5) wurden in der Vergangenheit mit Zellen durchgeführt, die eine aktivierungsbedingte Veränderung ihres CEACAM-Expressionsmusters aufwiesen. Daher sollten in dieser Arbeit aus einer Auswahl potentieller CEACAM1-Induktoren diejenigen Stimuli identifiziert werden, die zu einer signifikanten Zunahme der CEACAM1-Expression führen. Während in der Literatur einige wenige Daten zur quantitativen Veränderung der CEACAM1-Expression durch Stimulation vorliegen, lag es im Interesse dieser Arbeit, das durch Stimulation veränderte CEACAM-Expressionsmuster zudem auch qualitativ zu charakterisieren. Ein spezieller Fokus lag hier auf einer möglichen Koexpression weiterer CEACAM-Mitglieder, insbesondere des GPI-verankerten CEACAM6.

3.3.1 CEACAM1-Expression in der Durchflusszytometrie

Frisch isolierte PBMCs wurden wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben stimuliert. Die CEACAM1-Oberflächenexpression wurde durch extrazelluläres Färben mit dem FITC-gekoppelten CEACAM1-Antikörper B3 in der Durchflusszytometrie detektiert. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Expression der Oberflächenmoleküle. Als Negativkontrolle dienten dabei zeitgleich in reinem Zellmedium kultivierte PBMCs. Unspezifische Autofluoreszenzen der Zellen (Hintergrundfluoreszenz) wurden unter Mitführung einer nicht gefärbten Kontrolle berücksichtigt. Durch gezieltes *gating* der Lymphozyten im *Dot-Plot* wurden Monozyten- und Granulozytenverunreinigungen von der Auswertung der Daten ausgeschlossen und hatten somit keinen Einfluss auf die dargestellten Ergebnisse.

Wie auch in der Literatur beschrieben, exprimierten naive, frisch isolierte PBMCs (Tag 0) konstitutiv CEACAM1 in sehr geringer Menge auf ihrer Oberfläche. Gegenüber der Hintergrundfluoreszenz der Kontrolle zeigten die Tag 0 PBMCs eine deutlich höhere relative Fluoreszenz (Abb. 13). Diese war allerdings beträchtlichen probandenabhängigen Schwankungen (1,8- bis 4-fache der Ko) unterworfen. Diese Beobachtung ist leicht durch die Arbeit mit einem nicht-standardisierten Zellsystem zu erklären. So können Variationen in der Zusammensetzung der PBMC-Subpopulationen (3.1.2) oder probandenspezifische Präaktivierung der Zellen *in vivo* eine Erklärung für die dargestellten Schwankungen sein.

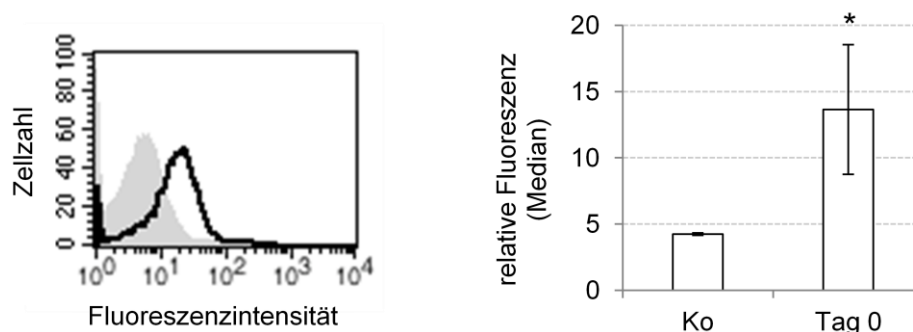


Abbildung 13: Konstitutive CEACAM1-Expression auf frisch isolierten, naiven PBMCs (Tag 0). Die CEACAM1-Oberflächenexpression naiver PBMCs (Tag 0) wurde durch direkte Markierung mittels FITC-gekoppeltem CEACAM1-Ak B3 durchflusszytometrisch detektiert. Die im *FACS-Overlay* grau hinterlegte Kurve zeigt die Hintergrundfluoreszenz der Kontrolle (Ko), die schwarze Kurve die Fluoreszenzintensität der CEACAM1-gefärbten Zellen. Die Daten zeigen drei unabhängige Versuche. Falsch hohe Fluoreszenzen durch Granulozytenverunreinigung wurden für die Auswertung durch *gating* der Daten ausgeschlossen. Das rechte Teilbild zeigt den Median \pm Standardabweichung der Fluoreszenzen ($n = 3$ *, $p < 0,05$) von drei Untersuchungen. Ko entspricht der Hintergrundfluoreszenz.

Eine signifikante Zunahme der CEACAM1-Expression gegenüber frisch isolierten PBMCs (Tag 0) konnte durch viertägige Stimulation der Zellen mit IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 gezeigt werden (Abb. 14). Im Vergleich zu den unstimulierten Tag 4 Kontrollzellen zeigten die stimulierten PBMCs eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität. (Abb. 14 A). Auf Grund der interindividuellen Schwankungen der konstitutiven CEACAM1-Expressionsstärke, stellte der Median der an Tag 0 gemessenen Fluoreszenzintensität (Abb. 13) keinen einheitlichen Bezugspunkt für den Vergleich der einzelnen Probanden untereinander dar. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurde daher die jeweilige Fluoreszenzintensität an Tag 0 für den individuellen Probanden als 1 definiert (Ko Tag 0). Die für jeden Probanden gemessene Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität nach Stimulation wurde dann ins Verhältnis zu der Fluoreszenz seiner frisch isolierten Tag 0 PBMCs (= 1) gesetzt. Abbildung 14 B zeigt die so dargestellten Ergebnisse. In der Hochregulation von CEACAM1 erwiesen sich alle drei Stimuli als ähnlich potent: IL7 zeigte eine Zunahme der CEACAM1-Expression um das 2,7-fache (2,1-3,1), IL2 um das 3,1-fache (2,5-4,3) und die Inkubation mit α CD3/ α CD28 führte zu einer 3,7-fachen (2,9-4,4) Erhöhung (Abb. 14 B, links). Die Inkubation der Zellen ausschließlich in Zellmedium (Ko Tag 4) führte zu keiner relevanten Erhöhung der konstitutiven CEACAM1-Expression.

Für die anderen untersuchten Zytokine (IL3, IL8, IL10, IFN γ , TNF α) sowie die eingesetzten Fc-Konstrukte (Ko-Fc, CEACAM8-Fc) und LPS war keine wesentliche Erhöhung der CEACAM1-Expression im Verlauf zu beobachten (Abb. 14 B, rechts). Da gemäß der Fragestellung drei zuverlässige Induktoren der CEACAM1-Expression identifiziert werden konnten, wurde auf eine wiederholte Untersuchung der scheinbar nicht CEACAM1-induzierenden Agenzien verzichtet.

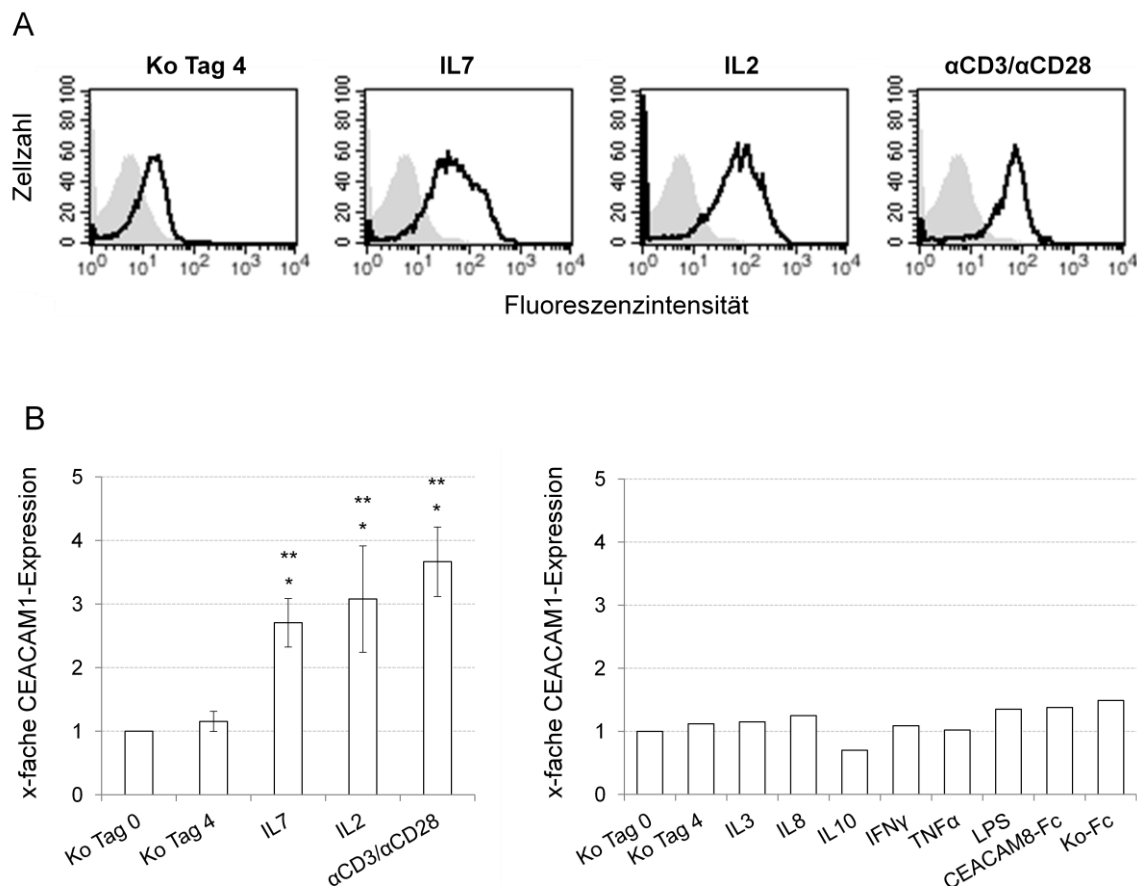


Abbildung 14: CEACAM1-Oberflächenexpression auf aktivierten PBMCs. Durchflusszytometrische Analyse der CEACAM1-Expression an Tag 4 der Stimulation mit verschiedenen Agenzien. (A) Darstellung im *FACS-Overlay*. Die grau hinterlegten Kurven zeigen die Hintergrundfluoreszenz der Kontrolle, die schwarze Kurve die Fluoreszenzintensität der CEACAM1-gefärbten Zellen, wobei Ko Tag 4 die in reinem Zellmedium kultivierten PBMCs darstellt. Die Daten zeigen die Ergebnisse fünf unterschiedlicher Probanden. (B) Vergleich der unterschiedlichen Stimuli. Die Ko Tag 0 zeigt die konstitutive CEACAM1-Expression, festgesetzt als Bezugspunkt auf 1. Tote Zellen wurden durch PJ-Färbung detektiert und ebenso wie Granulozytenverunreinigungen aus der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf unterschiedlichen Probanden \pm Standardabweichung im linken Teilbild. Verglichen wurden IL7-, IL2- und αCD3/αCD28-stimulierte PBMCs mit Ko Tag 0 ($n = 5$ *, $p < 0,05$) bzw. Ko Tag 4 ($n = 5$ **, $p < 0,05$). Für das rechte Teilbild ist $n = 1$.

Die CEACAM1-Hochregulation gegenüber den Kontrollzellen Tag 0 erfolgte nach einem zeitabhängigen Muster (Abb. 15): Eine geringe Zunahme der CEACAM1-Expression konnte bereits ab Tag 2 beobachtet werden. Mit allen Stimuli erreichten die Zellen das Expressionsmaximum zwischen dem 4. und 7. Tag der Stimulation und zeigten danach einen deutlichen Rückgang der CEACAM1-Oberflächenexpression. Ziel der kinetischen Analyse des Expressionsmusters war die Identifikation des Zeitpunktes maximaler CEACAM1-Expression zwecks Gewinnung von PBMCs mit möglichst hoher CEACAM1-Dichte für weiterführende Untersuchungen. Die wiederholte Messung der ausführlichen Kinetik (Tag 1-11), sowie die punktuelle Analyse der CEACAM1-Expression an bis zu 8 ausgewählten Messzeitpunkten zeigten übereinstimmende Ergebnisse. Auch hier galt die konstitutive CEACAM1-Expression (= 1) als Bezugspunkt.

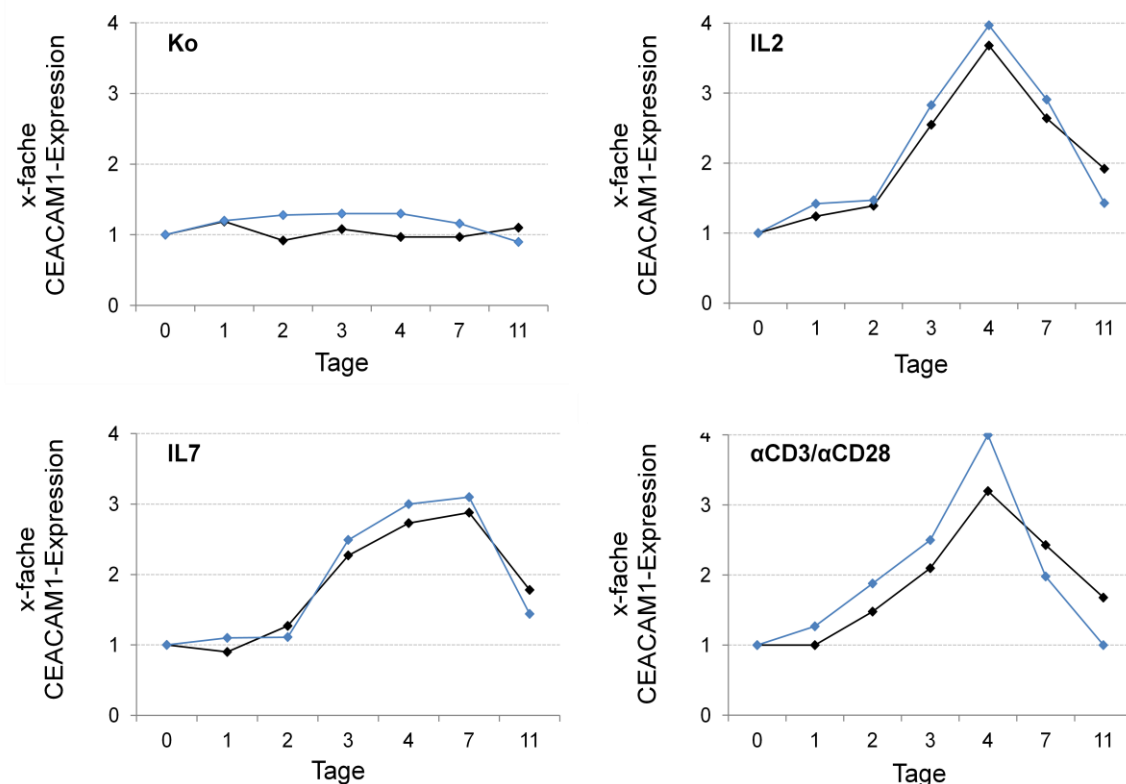


Abbildung 15.: Zeitverlauf der CEACAM1-Expression in aktivierten PBMCs. Die CEACAM1-Expression wurde an unterschiedlichen Tagen der Stimulation mit IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 durchflusszytometrisch bestimmt. Die toten Zellen wurden durch PJ-Färbung detektiert und ebenso wie Granulozytenverunreinigungen aus der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind die Daten zweier Probanden. Die punktuelle Analyse der CEACAM1-Expression bei unterschiedlichen Probanden an bis zu 8 ausgewählten Messzeitpunkten zeigte übereinstimmende Ergebnisse. Der signifikante Anstieg der CEACAM1-Expression an Tag 4 wurde ebenso mehrmals repliziert (Abb. 14).

3.3.2 CEACAM6-Expression in der Durchflusszytometrie

Während die Expression von CEACAM1 auf der Oberfläche von PBMCs durch die oben genannten Stimuli mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen für T- und B-Zellen weitestgehend konkordant sind (Kammerer et al., 1998; Boulton und Gray-Owen, 2002, Gray-Owen und Blumberg, 2006), gibt es in der Literatur Widersprüche bezüglich einer möglichen Expression weiterer CEACAM-Familienmitglieder. Diese Arbeit konnte zeigen, dass gegenteilig zu den vorherrschenden Meinungen neben CEACAM1 ebenso CEACAM6 unter Stimulation auf PBMCs exprimiert wird. Die Detektion des GPI-verankerten CEACAM6 erfolgte analog zur CEACAM1-Messung über extrazelluläres Färben mit FITC-gekoppeltem CEACAM6-Antikörper 13H10 (Aldevron) und anschließender Analyse im Durchflusszytometer unter Mitführen der notwendigen Kontrollen. Eine Verfälschung der Daten durch Verunreinigung mit ebenfalls CEACAM6-exprimierenden Granulozyten wurde bei der Datenauswertung ausgeschlossen.

CEACAM6-gefärbte, frisch isolierte Zellen (Ko Tag 0) wiesen gegenüber der Hintergrundfluoreszenz der nicht gefärbten Kontrolle (Ko) keine erhöhte Fluoreszenzintensität auf und zeigten somit keine nennenswerte konstitutive Expression von CEACAM6 auf ihrer Oberfläche (Abb. 16 A, 16 C). Gegenüber den naiven Zellen an Tag 0, sowie den unstimulierten Tag 4 Kontrollzellen konnte durch viertägige Stimulation mit IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 eine signifikante Induktion der CEACAM6-Expression beobachtet werden. Dies zeigte sich in einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität der stimulierten PBMCs (Abb. 16 B). Abbildung 16 C zeigt den Median der durchflusszytometrisch gemessenen relativen Fluoreszenzen eines repräsentativen Probandenkollektivs. Da keiner der untersuchten Probanden eine Expression von CEACAM6 auf den frisch isolierten PBMCs aufwies, stellte der Median der an Tag 0 gemessenen Fluoreszenzintensität einen einheitlichen Bezugspunkt dar. Daher sind, im Gegensatz zu Abbildung 14 (CEACAM1-Expression) die direkt gemessenen relativen Fluoreszenzen aufgetragen.

IL7 führte zu einer Zunahme um das 2,9-fache (0,8-5,4), IL2 um das 3,5-fache (0,7-5,6) und α CD3/ α CD28 zeigte eine 3,4-fache (2,5-4,2) Erhöhung der relativen Fluoreszenz gegenüber den frisch isolierten PBMCs (Tag 0). Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zeigte außerdem, dass durch reine Inkubation der PBMCs für 4 Tage, ohne Zusatz eines Stimulus, bereits probandenabhängig eine geringe Induktion der CEACAM6-Expression erfolgte. Die Kontrollzellen zeigten an Tag 4 im Vergleich zu

den naiven PBMCs Tag 0 eine um das 0,6-fache (0,3-1,1) erhöhte relative Fluoreszenz (Abbildung 16 C, links).

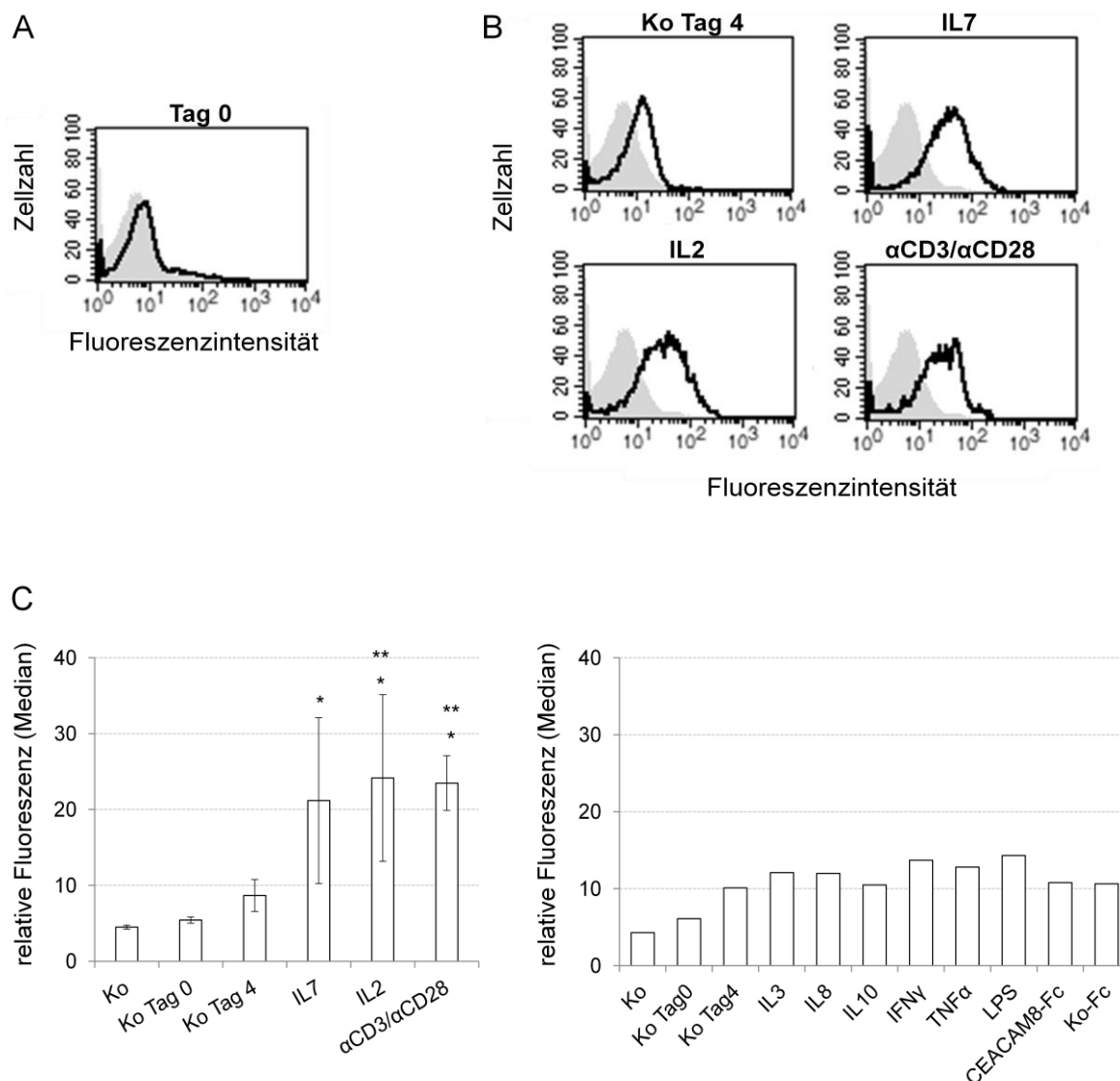


Abbildung 16: CEACAM6-Oberflächenexpression auf PBMCs. Die Zellen wurden zur Detektion der CEACAM6-Expression mit FITC-gekoppeltem anti CEACAM6 (13H10) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Frisch isolierte PBMCs (Tag 0) (A) sowie an Tag 4 der Stimulation analysierte Zellen (B) sind repräsentativ für fünf unterschiedlicher Probandensysteme im *FACS-Overlay* dargestellt. Die grau hinterlegte Kurve stellt die Hintergrundfluoreszenz der Kontrolle (Ko) dar, die schwarzen Kurven die Fluoreszenzintensität der CEACAM6-gefärbten PBMCs. (C) Vergleich der unterschiedlichen Stimuli. Ko stellt die Hintergrundfluoreszenz dar. Die toten Zellen wurden durch PJ-Färbung detektiert und ebenso wie Granulozytenverunreinigungen aus der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt ist der Median fünf unterschiedlicher Probanden \pm Standardabweichung im linken Teilbild. Verglichen wurden IL7-, IL2- und α CD3/ α CD28-stimulierte PBMCs mit der Ko Tag 0 ($n = 5^*$, $p < 0,05$) bzw. Ko Tag 4 ($n = 5^{**}$, $p < 0,05$). Für das rechte Teilbild ist $n=1$.

Im Gegensatz zur CEACAM1- war die CEACAM6-Expression auf aktivierten PBMCs probandenabhängig größeren Schwankungen unterworfen, ersichtlich an der großen Standardabweichung (Abb. 16 C). Zwar zeigten alle Probanden eine Induktion der Oberflächenexpression gegenüber den frisch isolierten Kontrollzellen an Tag 0, jedoch war diese bei einigen nur gering ausgeprägt, während andere Probanden eine um ein Vielfaches erhöhte CEACAM6-Expression zeigten. Wie auch für die Schwankungen der konstitutiven CEACAM1-Expression (Abb. 13), kann auch hier die unterschiedliche probandenspezifische Präaktivierung der Zellen *in vivo* eine Erklärung für die dargestellten Beobachtungen sein.

Alle anderen eingesetzten Agenzien führten unter Berücksichtigung der bereits leicht erhöhten Expression von CEACAM6 auf unstimulierten Kontrollzellen (Tag 4) zu keiner weiteren Zunahme der CEACAM6-Expression (Abb. 16 C, rechts). Da gemäß der Fragestellung dieser Arbeit eine Expression von CEACAM6 auf Lymphozyten durch drei verschiedene Stimuli nachgewiesen werden konnte, wurde auf eine wiederholte Untersuchung der andern Agenzien verzichtet.

Das zeitliche Muster der CEACAM6-Induktion entsprach in etwa der Kinetik der CEACAM1-Expression. Zur besseren Darstellung wurde die jeweilige Fluoreszenzintensität der naiven PBMCs (Tag 0) als Nullpunkt definiert, entsprechend der nicht vorhandenen CEACAM6-Expression dieser Zellen (Abb. 16). Die für den jeweiligen Probanden ermittelte relative Fluoreszenzintensität an jedem Messzeitpunkt wurde dann dazu ins Verhältnis gesetzt. Abbildung 17 zeigt die so dargestellten Daten zweier Probanden. Bereits ab dem 2. Tag konnte eine Zunahme (durchschnittlich 1,2-fach (IL2 und IL7) bis 1,7-fach (α CD3/ α CD28)) der CEACAM6-Expression auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Sie erreichte ihr Maximum am 4. Tag der Stimulation. Die hier dargestellte Kinetik der unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 17, oben links) zeigt die zuvor beschriebene geringfügige Induktion der CEACAM6-Expression (0,9-fach) durch ausschließliche Inkubation in Zellmedium mit einem Maximum an Tag 4. Bei allen Proben war anschließend ein deutlicher Abfall der CEACAM6-Oberflächenexpression zu beobachten. Sowohl die punktuelle Analyse der CEACAM6-Expression an bis zu 8 ausgewählten Messzeitpunkten als auch die Wiederholung der ausführlichen Kinetik (Tag 1-11) mit einem weiteren Probandensystem zeigten übereinstimmende Ergebnisse.

Im Hinblick auf spätere Assays mit aktivierten monozytenfreien PBMCs, ist zu bemerken, dass sich diese hinsichtlich ihres durch Stimulation veränderten CEACAM1- und

CEACAM6-Expressionsmusters nicht wesentlich von monozytenhaltigen PBMCs unterschieden.

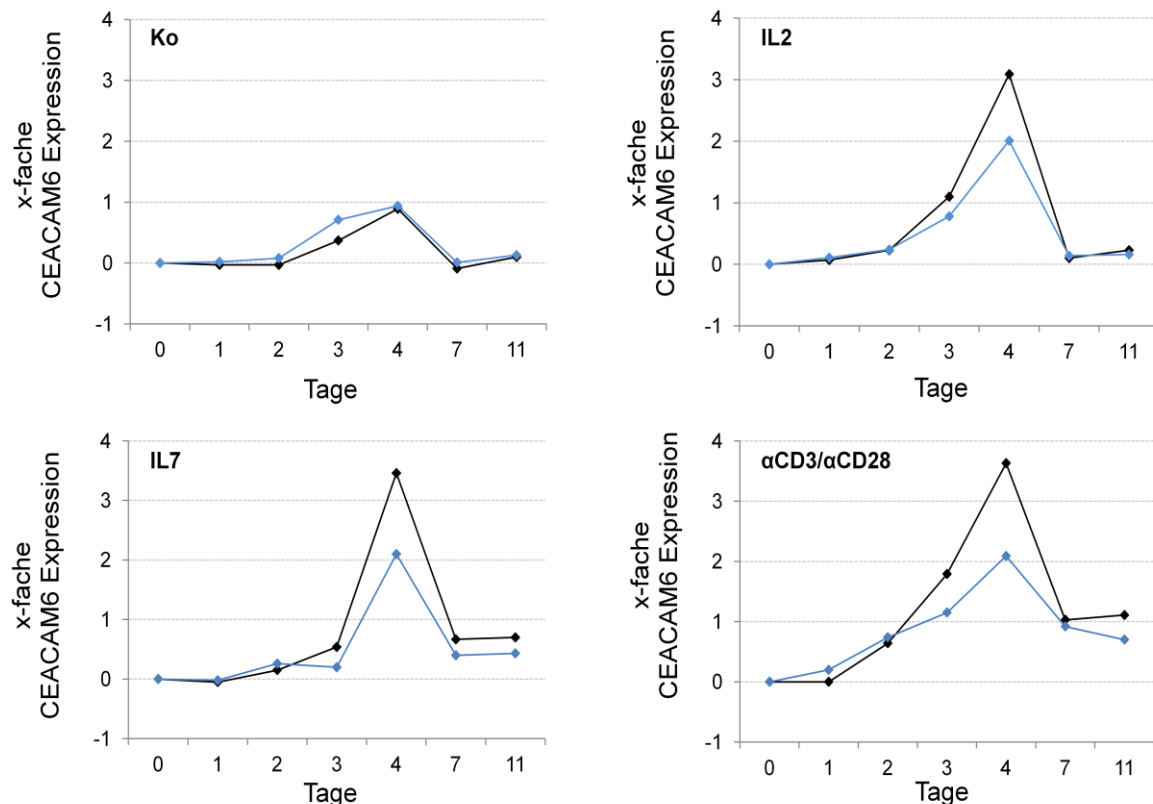


Abbildung 17.: Zeitverlauf der CEACAM6-Expression in aktivierten PBMCs. Die CEACAM6-Expression wurde an unterschiedlichen Tagen der Stimulation mit IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 durchflusszytometrisch bestimmt. Mittels PJ-Färbung wurden die toten Zellen ermittelt und ebenso wie Granulozytenverunreinigungen aus der Analyse ausgeschlossen. Dargestellt sind die Daten zweier Probanden. Die punktuelle Analyse der CEACAM6-Expression bei unterschiedlichen Probanden an bis zu 8 ausgewählten Messzeitpunkten zeigte übereinstimmende Ergebnisse. Der signifikante Anstieg der CEACAM6-Expression an Tag 4 wurde ebenso mehrmals repliziert (Abb. 16).

Zusammenfassend zeigten diese Beobachtungen eine Koregulation der CEACAM6- und CEACAM1-Expression auf der Oberfläche von Lymphozyten, der anteilig stärksten Subpopulation der PBMCs. Die CEACAM6-Expression ließ sich durch die gleichen Stimuli, wie auch für CEACAM1 gezeigt, induzieren und folgte dem gleichen kinetischen Verlauf. Vor dem Hintergrund der für Granulozyten und Epithelzellen beschriebenen regulatorischen Funktion von CEACAM6 (1.4), eröffnet die Anwesenheit eines weiteren CEACAM-Mitgliedes neue Perspektiven in der Analyse der CEACAM1-vermittelten

Effekte auf Lymphozyten und ist für zukünftige Untersuchungen somit von großer Bedeutung.

3.3.3 CEACAM1- und CEACAM6-Expression im Western Blot

Um die durchflusszytometrisch detektierte Expression von CEACAM6 und CEACAM1 auf unstimulierten und aktivierten PBMCs hauptsächlich qualitativ zu verifizieren, wurde ein direkter Proteinnachweis im Western Blot durchgeführt (2.2.3). Dazu wurden die Zellen zunächst lysiert, die Proteine in der Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurden CEACAM1 und CEACAM6 mittels spezifischer Antikörper detektiert. Lysat von frisch isolierten PMN wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Auf Grund granulozytenspezifischer Glykosylierungsmuster weist das von ihnen exprimierte CEACAM1 ein Molekulargewicht von 160 kDa auf (Kammerer et al., 1998). Im Gegensatz dazu hat das CEACAM1 der PBMCs ein Gewicht von 120 kDa. CEACAM6 hat eine Molekülmasse von rund 90 kDa, ist aber für Granulozyten in zwei unterschiedlichen Glykosylierungsformen beschrieben (Kuroki et al., 1992). Der hier verwendete Standard ließ nur eine grobe Einordnung der molekularen Masse der Proteinbanden zu, war aber ausreichend, um die spezifische Bindung der verwendeten Detektionsantikörper zu kontrollieren. Zum groben quantitativen Vergleich der Proben untereinander diente die Detektion von β -Aktin als Vergleichsmaß für die Menge an geladenem Gesamtprotein. Wie in Abbildung 13 gezeigt, exprimieren ruhende Lymphozyten konstitutiv nur geringe Mengen an CEACAM1. Die Analyse der Zelllysate mehrerer Probanden im Western Blot zeigte jedoch eine deutliche CEACAM1-Proteinbande der Tag 0 Kontrollzellen (Abb. 18). Durch den Vergleich des Molekulargewichtes dieser Bande mit der CEACAM1-Bande der PMN, konnte diese allerdings eindeutig auf die Kontamination der frisch isolierten PBMCs mit Granulozyten zurückgeführt werden. Mit Hilfe der groben Einordnung des Molekulargewichtes durch den verwendeten Standard konnten die Banden der anderen Proben als das lymphozytenspezifische, 120 kDa schwere CEACAM1 identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund war auch die besonders starke CEACAM6-Bande der Tag 0 Kontrollzellen durch die Kontamination mit Granulozyten erklärbar und stellte keinen Widerspruch zu den durchflusszytometrisch gemessenen Daten dar. Bereits geringe Mengen an PMN, die

auch bei ordnungsgemäßer Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation nicht völlig zu vermeiden waren, waren ausreichend für derart starke Banden. So zeigten die PMN-Kontrollen trotz kaum detektierbarer β -Aktin-Banden eine weitaus stärkere Expression an CEACAM1 und CEACAM6 als die PBMCs. Die mit IL7- und IL2-stimulierten Zellen zeigten gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen an Tag 0 und Tag 4 eine deutliche Zunahme der CEACAM1-Proteinbande (Abb. 18). Obwohl auch die mit α CD3/ α CD28 stimulierten PBMCs eine deutliche Proteinbande zeigten, war das Ausmaß der CEACAM1-Expression bei vielen Probanden niedriger als das der IL7- bzw. IL2-stimulierten Zellen. Die Koexpression von CEACAM6 durch PBMCs konnte im Western Blot entsprechend der durchflusszytometrischen Daten (3.3.2) bestätigt werden. Wie oben erwähnt, ist die starke Doppelbande der Tag 0 Kontrolle auf eine Kontamination mit Granulozyten zurückzuführen, die konstitutiv CEACAM6 in zwei Glykosylierungsformen exprimieren. Als Bezugs-Bande ist die Ko Tag 0 daher nicht zu verwerten. Bereits die unstimulierten Tag 4 Kontrollzellen zeigten bei einigen Probanden, wie auch in der Durchflusszytometrie, eine nachweisbare CEACAM6-Expression. Die unter 3.3.2 beschriebenen probandenabhängigen Schwankungen der CEACAM6-Expression nach Stimulation spiegelten sich auch in der unterschiedlich starken Ausprägung der detektierten Proteinbanden im Western Blot wieder. Während in Abbildung 18 nur die Stimulation mit IL2 zu einer deutlichen Zunahme der CEACAM6-Expression gegenüber den unstimulierten Tag 4 Zellen führte, zeigten die Zell-Lysate anderer Probanden eine Zunahme der CEACAM6-Expression sowohl durch IL2 und IL7. Analog zur CEACAM1-Expression zeigten auch hier die meisten Probanden unter Stimulation mit α CD3/ α CD28 nur eine schwache CEACAM6-Bande. Die Detektion der CEACAM6-Expression im Durchflusszytometer hatte eine CEACAM6-Induktion durch alle Stimuli gezeigt (Abb. 16). Zusammenfassend konnte somit im Western Blot die Expression bzw. Hochregulation von CEACAM6 und CEACAM1 in aktivierten PBMCs bestätigt werden. Dabei fielen die Proteinbanden im Western Blot für IL2- und IL7-stimulierte Zellen durchschnittlich stärker aus als die Banden der α CD3/ α CD28-stimulierten Zellen. Die durchflusszytometrisch erhobenen Daten zeigten allerdings eine deutliche Hochregulation von CEACAM1 und CEACAM6 auf der Zelloberfläche durch alle drei Stimuli (3.3.1; 3.3.2). Bei probandenabhängigen Schwankungen vor allem der CEACAM6-Expression und den oben beschriebenen Granulozytenverunreinigungen wurde auf eine zusammenfassende semiquantitative densitometrische Analyse verzichtet.

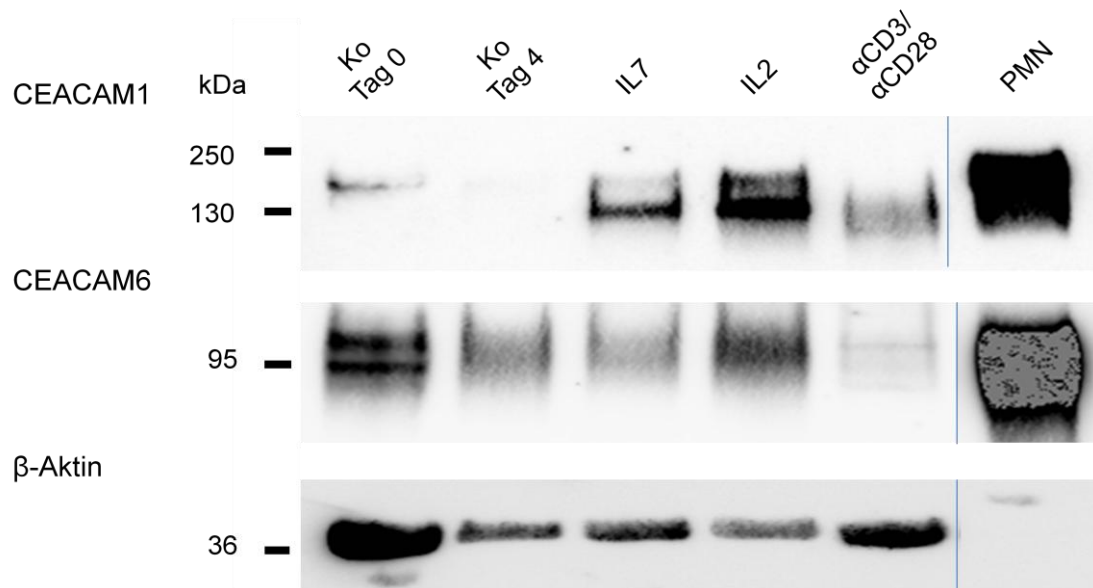


Abbildung 18: Analyse der CEACAM1- und CEACAM6-Expression in PBMCs im Western Blot. Frisch isolierte PBMCs wurden an Tag 0 lysiert (Ko Tag 0). IL2-, IL7-, und α CD3/ α CD28-stimulierte PBMCs sowie die unstimulierten Kontrollzellen (Ko Tag 4) wurden an Tag 4 der Stimulation lysiert. Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden anschließend im Western Blot analysiert. Die immunologische Färbung erfolgte mit CEACAM1-Ak (4/3/17) sowie CEACAM6-Ak (13H10) und Visualisierung über einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Lysat frisch isolierter PMN wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin mittels HRP-konjugiertem Ak detektiert. Die Molekulare Masse in Kilodalton (kDa) ist auf der linken Seite einzusehen. Der dargestellte Blot ist repräsentativ für fünf Versuche mit PBMCs unterschiedlicher Probanden, jeweils mit ähnlichem Ausgang.

3.3.4 Expression der CEACAM1-Isoformen und CEACAM6 in der PCR

Im Menschen sind theoretisch 12 verschiedene Splice-Varianten von CEACAM1 möglich. Während der funktionelle Unterschied zwischen den Isoformen mit variabler Anzahl an extrazellulären Domänen noch unklar ist, beeinflusst die Länge der zytoplasmatischen Domäne die Eigenschaften von CEACAM1 als zellulären Rezeptor (1.3.1). Während auf Lymphozyten von Ratten und Mäusen CEACAM1-S Isoformen detektiert wurden, konnten auf humanen Lymphozyten bisher entweder ausschließlich CEACAM1-3L und CEACAM1-4L (Singer et al., 2002; Kammerer et al., 1998) oder nur kleine Mengen der S-Isoform nachgewiesen werden (Chen und Shively, 2004). Es stellte sich jedoch die Frage, ob eine Hochregulation der CEACAM1-Expression durch IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 möglicherweise auch mit einer Veränderung des Isoformenexpressionsmusters einhergeht. Da die verwendeten CEACAM1-Ak nur die extrazellulären Domänen erkennen und somit

nicht zwischen L- und S-Form unterscheiden können, sollte diese Frage mittels PCR der revers transkribierten zellulären RNA beantwortet werden. Des Weiteren sollte die mittels durchflusszytometrischer Analyse und im Western Blot gezeigte Expression von CEACAM6 auf translationaler Ebene nochmals verifiziert werden. Als Kontrollzellen dienten sowohl naive PBMCs (Tag 0), als auch für 4 Tage ohne Stimulus kultivierte Zellen. Plasmidkontrollen der jeweils zu amplifizierenden cDNA dienten als Nachweis für den Erfolg der jeweiligen PCR. Eine Verunreinigung der Proben durch fremdes DNA-Material konnte durch saubere Wasserproben ausgeschlossen werden. Um den Erfolg der reversen Transkription der mRNA in cDNA zu überprüfen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrollgen amplifiziert. Ebenso konnte so die DNA-Beladung der jeweiligen Probe überprüft werden. Abbildung 19 repräsentiert die Ergebnisse der molekularbiochemischen Untersuchungen.

Wie bereits im Western Blot beschrieben (3.3.3), zeigte hier der Nachweis von CEACAM8 als granulozytenspezifisches PCR-Produkt eine Verunreinigung der Tag 0 Kontrolle mit PMN. In Abbildung 19 A zeigten auch die Tag 4 Kontrollzellen eine schwache CEACAM8 Bande. Vor diesem Hintergrund waren die CEACAM1-Isoform-Banden der Kontrollzellen zu einem nicht unwesentlichen Teil auf Granulozytenkontamination zurückzuführen und daher nur eingeschränkt als Bezugs-Banden zu verwerten. Die Detektion der einzelnen PCR-Produkte zeigte, dass unter Stimulation mit IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 neben den Isoformen mit langer zytoplasmatischer Domäne auch CEACAM1-3S und CEACAM1-4S exprimiert wurden. Die Kontrollzellen (Tag 0 und Tag 4) hingegen zeigten probandenabhängig keine oder nur dezente Banden der kurzen Isoformen. Zwischen den frisch isolierten PBMCs (Tag 0) und den für 4 Tage kultivierten Kontrollzellen konnte bei allen Probanden kein wesentlicher Unterschied im Isoformenexpressionsmuster detektiert werden. Daraus war zu schließen, dass die bloße Kultivierung der PBMCs in Zellmedium keinen Einfluss auf das CEACAM1-Isoformenverhältnis hat. Obwohl ein genauer quantitativer Vergleich der PCR-Produkte mittels einfacher PCR nicht zulässig ist, konnte anhand dieser Daten jedoch vermutet werden, dass die in der Durchflusszytometrie (3.3.1) und im Western Blot (3.3.3) detektierte Zunahme der CEACAM1-Expression unter Stimulation möglicherweise zu einem nicht unwesentlichen Teil durch die Hochregulation der kurzen Isoformen mitbestimmt wurde, während unstimulierte Zellen hauptsächlich die langen Isoformen zu exprimieren scheinen.

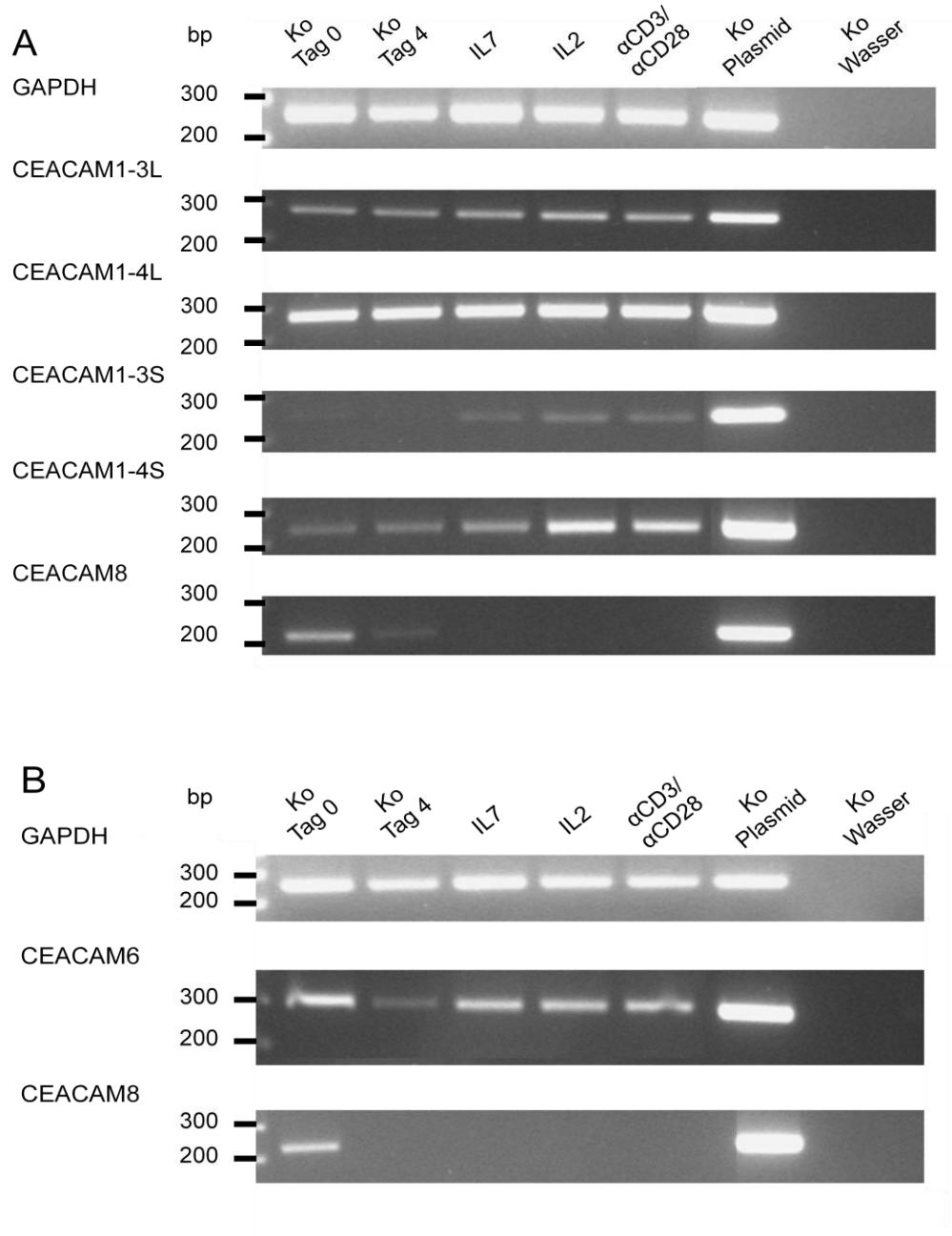


Abbildung 19: Analyse der CEACAM1-Isoformen und des CEACAM6-Expressionsmusters in PBMCs mittels PCR. Die mRNA wurde nach viertägiger Stimulation mit IL7, IL2 und αCD3/αCD28 isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der PCR mittels spezifischer Primer amplifiziert. Als Kontrollzellen wurden frisch isolierte PBMCs (Ko Tag 0) und für 4 Tage in Zellmedium inkubierte Zellen (Ko Tag 4) mitgeführt. Als Ladungskontrolle und Indikator einer erfolgreichen reversen Transkription wurde die cDNA des *Housekeeping*-Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. Zum Nachweis von Granulozytenkontamination der Proben wurde CEACAM8 amplifiziert. Als Positivkontrolle diente Plasmid-DNA der jeweils zu amplifizierenden cDNA-Form. Die Balken zeigen die Größenordnung der PCR-Produkte in Anzahl der Basenpaare (bp). Die dargestellten Ergebnisse für CEACAM1 (A) und CEACAM6 (B) repräsentieren vier Versuche mit PBMCs unterschiedlicher Probanden.

Um die Koexpression von CEACAM6 mit CEACAM1 unter Stimulation durch einen weiteren Versuchsansatz zu bestätigen, wurde revers transkribierte CEACAM6-cDNA mittels spezifischer Primer in der PCR durch Amplifikation detektiert. Abbildung 19 B repräsentiert die so gewonnenen Daten. Der positive Nachweis von CEACAM8 in den frisch isolierten Kontrollzellen (Tag 0) zeigte deren Granulozytenverunreinigung an. Vor diesem Hintergrund ist die positive CEACAM6-Bande der naiven PBMCs auf das Vorhandensein von granulozytärem cDNA-Material zurückzuführen. Auch hier ließ sich für die mit IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 stimulierten PBMCs eine deutliche CEACAM6-Expression auf translationaler Ebene beobachtet. Wie in der Durchflusszytometrie (3.2.1) und im Western Blot (3.2.3) beobachtet, zeigten auch die Kontrollzellen Tag 4 eine nachweisbare CEACAM6-Expression. Auf Grund der Verunreinigung mit Granulozyten war allerdings ein direkter Vergleich mit der CEACAM6-Expression naiver PBMCs auf translationaler Ebene nicht möglich.

Zusammenfassend zeigten die in Kapitel 3.3 beschriebenen Ergebnisse, dass eine Aktivierung von PBMCs zu einer deutlichen Hochregulation der CEACAM1-Expression führt, sowohl auf der Zelloberfläche als auch auf translationaler und transkriptionaler Ebene. Des Weiteren zeigten stimulierte Zellen eine deutliche Expression der kurzen CEACAM1-Splice-Varianten. Somit ließ sich vermuten, dass die Zunahme der CEACAM1-Expression scheinbar zu einem nicht unwesentlichen Teil auf die Hochregulation der kurzen Isoformen zurückzuführen ist.

Ebenfalls zeigten die Daten übereinstimmend eine deutliche Induktion der CEACAM6-Expression in stimulierten PBMCs gegenüber naiven Zellen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass sich durch die Expression unterschiedlicher CEACAM1-Isoformen und der Koexpression eines weiteren CEACAM-Mitgliedes die Regulation der CEACAM1-vermittelten Effekte auf Lymphozyten als weitaus komplexer gestaltet als bisher angenommen.

3.4. Der Einfluss von löslichem CEACAM8 auf naive PBMCs

3.4.1 Ergebnisse des B-Zell-Proliferationsassays

Verschiedene von CEACAM1-vermittelte Effekte auf Immunzellen wie NK-Zellen, Dendritische Zellen oder T-Zellen wurden bisher beschrieben (1.3.2.4). Seine funktionelle Bedeutung als Korezeptor in humanen B-Zellen ist bisher jedoch kaum untersucht (1.3.2.4.3). Während Untersuchungen in der Vergangenheit CEACAM1-Antikörper (Greicius et al., 2003) oder pathogene Erreger (Pantelic et al., 2005) als CEACAM1-Liganden verwendeten, war es Ziel dieser Arbeit erstmals den Effekt eines *physiologischen* Liganden des CEACAM1-Rezeptors auf die Funktion peripherer naiver B-Zellen zu untersuchen. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs für 4 Tage mit CEACAM8-Fc und B-Zell-spezifischen Stimuli (2.2.2.3, Tabelle 2) inkubiert. Die Proliferationsrate wurde anschließend im ELISA über den Einbau von BrdU in die zelluläre DNA gemessen. Um mit einem Testsystem zu arbeiten, das den physiologischen *in vivo* Bedingungen am besten entspricht, wurde auf eine reine Isolation der B-Zellen verzichtet. Durch die Verwendung B-Zell-spezifischer Antikörper wurde jedoch gewährleistet, dass die zu beobachtenden Effekte auf die Reaktion der B-Zellen zurückzuführen sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass zur effektiven Initiierung der B-Zell-Stimulation idealerweise immer zwei Signale benötigt werden: Einerseits die Stimulation des BZR-Komplexes, andererseits die Kostimulation über CD40 (1.3.2.3.3). Dieses System wurde als Positivkontrolle verwendet. Als Bezugskontrolle dienten Zellen, die für 4 Tage ausschließlich in Medium kultiviert wurden. Als nicht-CEACAM1-bindende Kontrolle wurde Ko-Fc (CEACAM1dN-Fc) eingesetzt.

Wie α IgM und α CD40 zeigte auch CEACAM8-Fc alleine keine proliferationsinduzierende Wirkung (Abb. 20). Eine Kombination von α IgM zusammen mit CEACAM8 wirkte jedoch ähnlich proliferationsstimulierend wie das bekannte System α IgM/ α CD40. Allerdings zeigten die frisch isolierten PBMCs eher inkonsistente Ergebnisse mit größeren probandenabhängigen Schwankungen: Während einige Probanden eine deutliche Zunahme der Proliferation zeigten, fiel diese bei anderen nur gering aus.

Überraschenderweise zeigte aber auch die Negativkontrolle mit Ko-Fc, insbesondere in Kombination mit α IgM eine BZR-kostimulatorische Wirkung. Da Ko-Fc als N-Domäne depletiertes CEACAM1-Fc Konstrukt nicht mit CEACAM1 interagiert, war eine mögliche

Erklärung für diese Beobachtung die Vermittlung kostimulatorischer Signale über die Bindung seines Fc-Teils an stimulatorische Fc-Rezeptoren. Hierdurch wurden die Zellen möglicherweise zur Proliferation angeregt (4.3). Während ihre Existenz auf B- und T-Zellen umstritten ist, werden stimulatorische Fc-Rezeptoren konstitutiv auf Monozyten, dendritischen Zellen, Neutrophilen und Mastzellen exprimiert (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

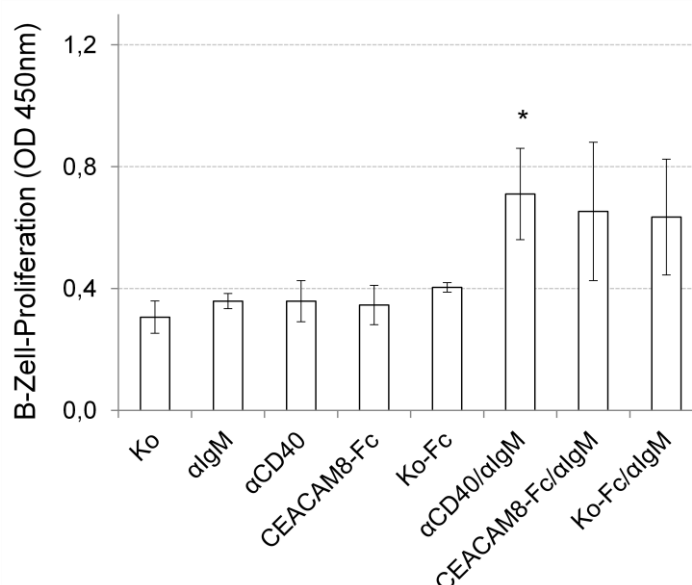


Abbildung 20: Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation in frisch isolierten, nicht-monozytenfreien PBMCs. Über den Einbau des Thymidin-Analogons BrdU in die zelluläre DNA, wurde die Proliferationsrate am 4. Tag der Stimulation mit dem B-Zell-spezifischen Ak (α CD40) sowie α IgM, in Kombination mit CEACAM8-Fc und dem nicht CEACAM1-bindenden Ko-Fc kalorimetrisch bestimmt. Nicht stimulierte Zellen (für 4 Tage in reinem Medium) waren die Kontrolle (Ko). Die optische Dichte (OD) bei 450 nm war proportional zur Zellproliferationsrate. Jede Messung erfolgte als Triplikat. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung für Untersuchungen an drei unterschiedlichen Probanden ($n = 3$ *, $p < 0,05$ verglichen mit α IgM).

Insgesamt ließ sich sehr wage eine Tendenz für einen kostimulatorischen Effekt des löslichen CEACAM8 über Bindung an CEACAM1 ableiten. Auf Grund der Inhomogenität der Daten konnte allerdings eine abschließende Aussage hierüber nicht getroffen werden. Fraglich blieb auch, ob die bei einigen Probanden beobachtete Zunahme der Proliferation in Kombination mit α IgM über die spezifische Bindung der N-Domäne des CEACAM8-Fc an CEACAM1 vermittelt wurde. Wie die Negativkontrolle durch ihren scheinbar ähnlich kostimulatorischen Effekt implizierte, war nicht auszuschließen, dass diese Beobachtung

auch durch die Interaktion des Fc-Teils des durch Transfektion generierten CEACAM8-Fc mit Fc-Rezeptoren bedingt wurde.

Da das Testsystem neben B-Zellen aus direkt mit diesen interagierenden T-Zellen, sowie NK-Zellen und Monozyten bestand (3.1.2), sollte untersucht werden, ob in einem weniger komplexen System homogenere Daten akquiriert werden können. Um dennoch möglichst physiologische Bedingungen beizubehalten, wurden aus den frisch isolierten PBMCs nur die Monozyten über das in 2.2.1.2 beschriebene Verfahren entfernt. So blieb die Möglichkeit einer T-Zell-regulierten Reaktion der B-Zellen, wie sie auch *in vivo* zu beobachten ist, bestehen. Die monozytenfreien PBMCs wurden ebenfalls mittels BrdU-Assay hinsichtlich ihrer Proliferationsrate untersucht. Tatsächlich zeigten sich homogenere Ergebnisse mit deutlicheren Effekten der Stimuli auf die Zellproliferation. Während α IgM und α CD40 alleine keine Stimulation bewirken konnten, zeigte die Kombination beider Stimuli einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 21). Im Gegensatz zu den nicht-monozytenfreien Zellen zeigte lösliches CEACAM8 in Kombination mit α IgM wiederholt eine ebenso signifikante Kostimulation der BZR-vermittelten Proliferation. Lösliches CEACAM8 allein hatte keinen Effekt. Obwohl der kostimulatorische Effekt durchschnittlich geringer ausfiel als bei der Positivkontrolle (α IgM/ α CD40), konnte lösliches CEACAM8 somit als ein fast equipotenter Kostimulus zu dem klassischen Stimuluspaar α IgM/ α CD40 identifiziert werden. Die nicht CEACAM1-bindende Kontrolle (Ko-Fc) zeigte, anders als bei den nicht-monozytenfreien Zellen, konstant niedrige Proliferationsraten, ähnlich der unstimulierten Kontrollzellen. Der hier beobachtete kostimulatorische Effekt des löslichen CEACAM8 schien somit tatsächlich auf die spezifische Bindung an dessen physiologischen Rezeptor, CEACAM1, zurückzuführen zu sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde als nächstes untersucht, ob durch Blockierung der N-Domäne des CEACAM8-Fc durch den spezifischen Ak 6/40c (2.1.9.2) der zuvor beobachtete kostimulatorische Effekt inhibiert wird (Abb. 21B). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die CEACAM8-vermittelte Kostimulation durch funktionelles Ausschalten der N-Domäne unterbunden wird. So wiesen die mit α IgM und blockiertem CEACAM8-Fc inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen keine erhöhte Proliferationsrate mehr auf. Da die durch α IgM/CEACAM8-Fc induzierte Proliferation in Kombination mit der Isotypkontrolle IgG Ko nicht inhibiert wurde, konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt

durch den Blockierungsantikörper selber verursacht wurde, sondern eindeutig auf die Blockade der N-Domäne des CEACAM8 zurückzuführen war.

Zusammenfassend erwies sich lösliches CEACAM8 durch die spezifische, N-Domäne-vermittelte Bindung an CEACAM1 als ein potenter Kostimulus der naiven B-Zell-Funktion. Die von einigen Gruppen beschriebene inhibitorische Wirkung einer CEACAM1-Bindung auf B-Zellen konnte nicht bestätigt werden.

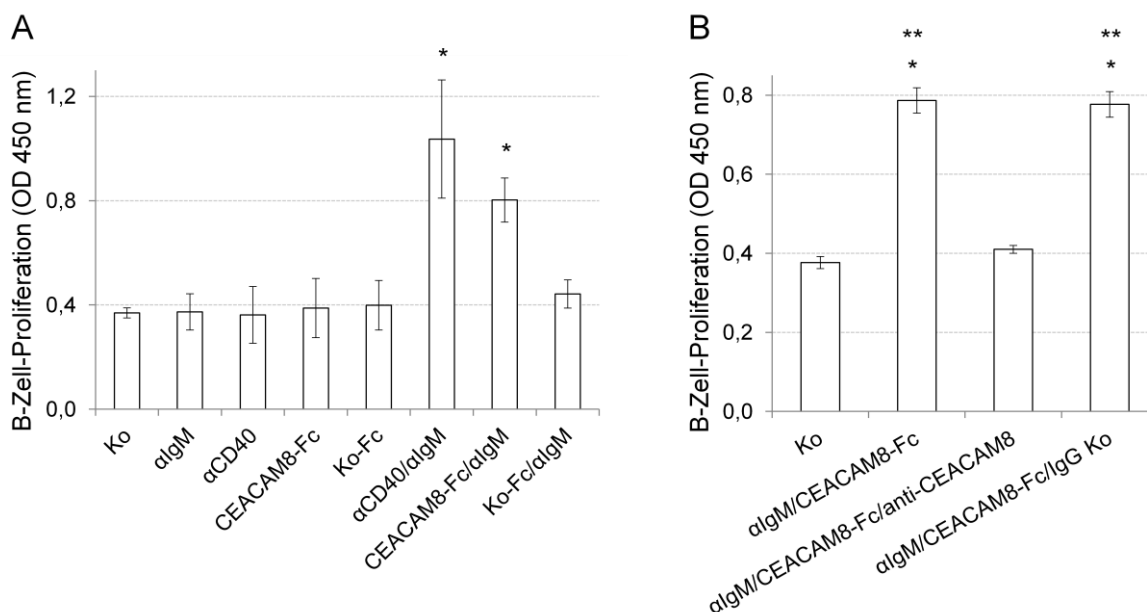


Abbildung 21: Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation in frisch isolierten, monozytenfreien PBMCs. Die Proliferationsrate wurde an Tag 4 der Stimulation über den Einbau von BrdU in die zelluläre DNA kalorimetrisch bestimmt. Jede Messung erfolgte als Triplikat. Alle Daten zeigen die Mittelwerte der OD bei 450 nm \pm Standardabweichung für drei Untersuchungen an unterschiedlichen Probanden. (A) Stimulation mit B-Zell-spezifischen Ak (α CD40) sowie α IgM, in Kombination mit CEACAM8-Fc und dem nicht-CEACAM1-bindenden Ko-Fc ($n = 3$ *, $p < 0,05$ im Vergleich mit α IgM). (B) Inkubation von PBMCs mit ungeblocktem und an seiner N-Domäne blockiertem CEACAM8-Fc in Kombination mit α IgM. Als Isotypkontrolle diente IgG. Vergleich von α IgM/CEACAM8-Fc und α IgM/CEACAM8-Fc/IgG Ko mit Ko ($n = 3$ *, $p < 0,05$) und α IgM/CEACAM8/anti-CEACAM8 ($n = 3$ **, $p < 0,05$).

3.4.2 Ergebnisse des T-Zell-Proliferationsassays

Obwohl die Rolle von CEACAM1 als Korezeptor auf T-Zellen bereits Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen war, liefern diese bisher eher widersprüchliche Ergebnisse (1.3.2.4.2). Während in einigen Studien ein koinhibierender Effekt auf T-Zellen beschrieben wurde (Chen et al., 2001, Chen et al., 2004), gibt es andere Untersuchungen,

die zeigen, dass CEACAM1-spezifische Antikörper die Proliferation humaner T-Zellen stimulieren (Kammerer et al., 1998; Donda et al., 2000). In allen bisherigen Arbeiten wurden zur Untersuchung der CEACAM1-vermittelten Effekte ausschließlich unphysiologische Antikörper als CEACAM1-Liganden verwendet. Vor dem Hintergrund des in 3.4.1 beschriebenen kostimulatorischen Effektes von löslichem CEACAM8 auf naive B-Zellen, sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen dieses physiologischen CEACAM1-Liganden ebenso auf T-Zellen untersucht werden. Hierbei lag allerdings der Schwerpunkt auf dem Vergleich des Verhaltens von zuvor stimulierten Zellen gegenüber naiven PBMCs. Zunächst wurden naive Zellen mittels BrdU-Proliferationsassay untersucht. Auch hier wurde auf die Isolation einer reinen T-Zell-Population verzichtet, zwecks des Erhalts eines möglichst physiologischen Testsystems. Durch die Verwendung T-Zell-spezifischer Stimuli konnten die zu beobachtenden Effekte als spezifische Reaktion der T-Zellen interpretiert werden. Der Assay wurde wie in 2.2.2.3 beschrieben angesetzt. Als Positivkontrolle diente die Kombination von α CD3 mit α CD28, als nicht-CEACAM1-bindende Kontrolle diente Ko-Fc. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse des T-Zell-Assays.

Nicht-monozytenfreie PBMCs zeigten, wie auch schon die B-Zellen, sehr inhomogene Ergebnisse (Abb. 22, graue Balken). Die alleinige Inkubation mit α CD3 führte bereits zu einer deutlichen Zunahme der Proliferationsrate gegenüber den Kontrollzellen. Diese konnte durch die Kombination mit dem Kostimulus α CD28 zwar signifikant aber nur noch geringfügig gesteigert werden. Ebenso zeigte die nicht CEACAM1-bindende Kontrolle (Ko-Fc) in Kombination mit α CD3 eine unerwartet hohe Proliferationsrate. Anhand dieser Ergebnisse war die Funktion des löslichen CEACAM8 als potenzieller Kostimulus der TZR-vermittelten Zellaktivierung zwar ersichtlich, aber eine genauere Aussage nur eingeschränkt möglich.

In Anlehnung an den B-Zell-Assay wurden auch monozytenfreie PBMCs untersucht (Abb. 22, weiße Balken). Für frisch isolierte, monozytenfreie PBMCs ergaben sich deutlich homogenere Ergebnisse. CEACAM8-Fc in Kombination mit α CD3 führte zu einer signifikanten Induktion der TZR-vermittelten Proliferation. Das Ausmaß der Proliferation war ähnlich hoch wie die durch Kombination der klassischen Stimuli α CD3/ α CD28 beobachtete Proliferationsrate. Die Fc-Kontrolle zeigte weder alleine noch in Kombination mit α CD3 einen Effekt. Somit konnte auch für naive T-Zellen ein kostimulatorischer Effekt von löslichem CEACAM8 auf die TZR-vermittelte Zellproliferation gezeigt werden.

Bei einem Vergleich des T- und B-Zell-Assays ist zu berücksichtigen, dass für den B-Zellassay 90.000 Zellen pro Ansatz eingesetzt wurden, während 30.000 Zellen für die Untersuchung der T-Zell-Proliferation verwendet wurden (2.2.2.3). Zusammenfassend scheint lösliches CEACAM8 eine wichtige Rolle in der Regulation und Initiierung der Immunantwort naiver Lymphozyten zu spielen. Weder für B- noch T-Zellen konnte ein inhibitorischer Effekt durch CEACAM1-spezifische Ligation mittels löslichem CEACAM8 nachgewiesen werden.

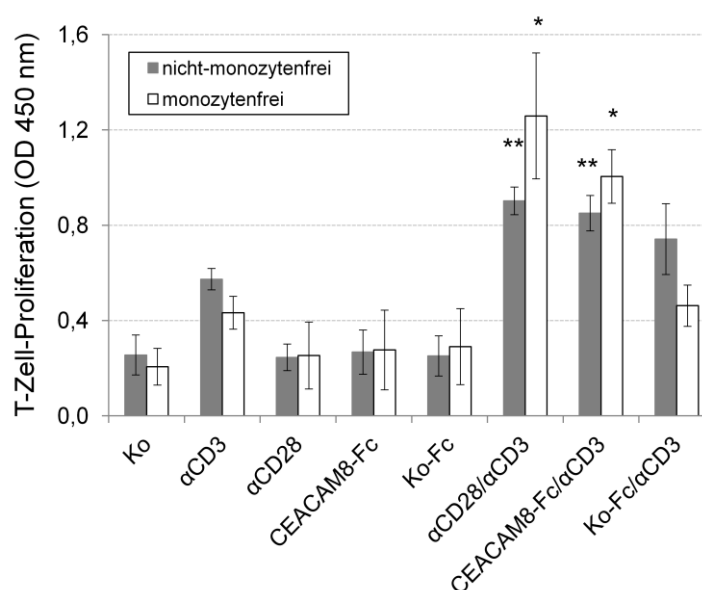


Abbildung 22: Effekt von löslichem CEACAM8 auf die T-Zell-Proliferation in frisch isolierten PBMCs. Monozytenfreie und nicht-monozytenfreie PBMCs wurden mit T-Zell-spezifischen Ak (α CD3, α CD28), in Kombination mit CEACAM8-Fc und dem nicht CEACAM1-bindenden Ko-Fc inkubiert. Die Proliferationsrate wurde am 4. Tag der Stimulation über die Detektion des BrdU-Einbaus in die zelluläre DNA kalorimetrisch bestimmt. Jede Messung erfolgte als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der im ELISA ermittelten ODs (450 nm) für drei Untersuchungen unterschiedlicher Probanden. Die monozytenfreien ($n = 3$ *, $p < 0,05$) bzw. nicht-monozytenfreien PBMCs ($n = 3$ **, $p < 0,05$) wurden mit den α CD3 stimulierten Zellen des jeweiligen Testsystems verglichen.

3.5 Der Einfluss von löslichem CEACAM8 auf aktivierte PBMCs

Alle Arbeiten, die einen inhibitorischen Effekt von CEACAM1 auf humane T- und B-Zellen postulieren, fanden interessanterweise an zuvor stimulierten PBMCs oder transformierten Zelllinien statt. Vor dem Hintergrund der in 3.3 beschriebenen

Veränderung des CEACAM-Expressionsmusters unter Stimulation, war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob sich zuvor aktivierte von frisch isolierten PBMCs hinsichtlich ihrer Reaktion auf lösliches CEACAM8 unterscheiden. Dazu wurden frisch isolierte monozytenfreie PBMCs für 4 Tage mit IL2 und α CD3/ α CD28 vorstimuliert, bevor sie dann mittels B- und T-Zell-spezifischem BrdU-Proliferationsassay (3.4.1; 3.4.2) untersucht wurden. Da bei der genaueren Analyse der Zytokine IL2 und IL7 kein wesentlicher Unterschied in der Qualität der Zellstimulation (3.2) und der Veränderung des CEACAM-Expressionsmusters (3.3) beobachtet worden war, wurde auf die gesonderte Untersuchung IL7-stimulierter Zellen verzichtet. Als Kontrolle wurden PBMCs mitgeführt, die für 4 Tage in Zellmedium ohne Stimulus inkubiert wurden. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der B-Zell-Proliferation.

Für IL2-stimulierte Zellen ließ sich kein kostimulatorischer Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation mehr nachweisen. Auch die Kombination des klassischen Stimuluspaares α IgM und α CD40 zeigte nur eine geringe Induktion der Zellproliferation (Abb. 23, rechts).

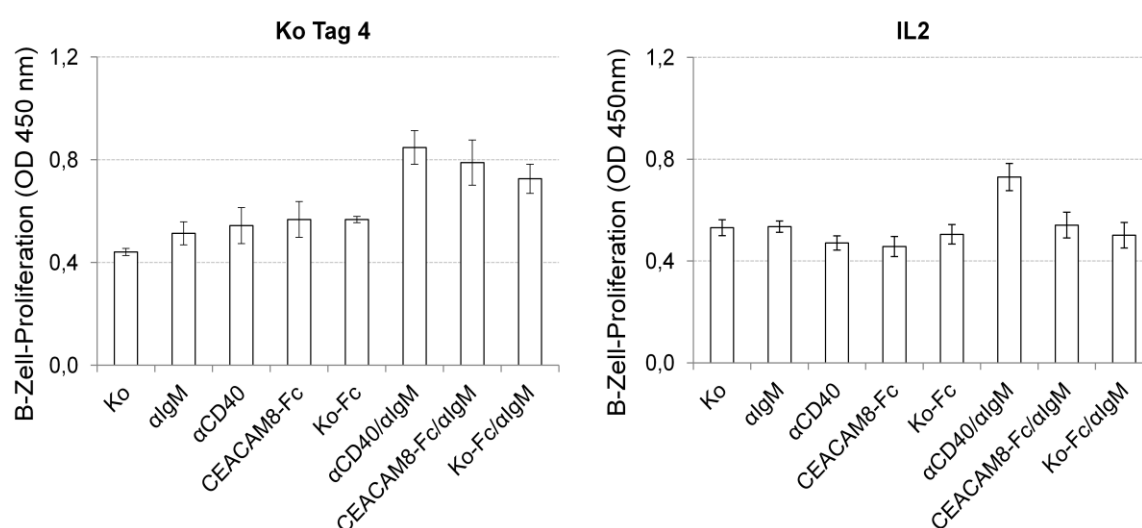


Abbildung 23: Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation in zuvor aktivierten, monozytenfreien PBMCs. Frisch isolierte monozytenfreie PBMCs wurden zuerst für 4 Tage mit IL2 oder in Zellmedium ohne Stimulus (Ko Tag 4) inkubiert und danach 4 Tage mit B-Zell-spezifischen Ak (α CD40) sowie α IgM, in Kombination mit CEACAM8-Fc und dem Ko-Fc inkubiert. Über den Einbau von BrdU in die zelluläre DNA, wurde die Proliferationsrate am 4. Tag der Restimulation bestimmt. Die Messungen erfolgten als Triplikate. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert (OD= 450 nm) \pm Standardabweichung. Die Daten zeigen vier unabhängige Versuche mit unterschiedlichen Probanden.

Interessanterweise unterschieden sich auch die Ergebnisse der zuvor für 4 Tage in reinem Zellmedium kultivierten Kontrollzellen (Abb. 23, links) von den Daten der naiven, monozytenfreien B-Zellen. Die Kombination von α IgM mit α CD40 oder löslichem CEACAM8 führte zwar zu einer Zunahme der Proliferation, die aber nicht so deutlich ausfiel wie für die frisch isolierten monozytenfreien B-Zellen gezeigt (Abb. 21). Außerdem zeigte die Negativkontrolle Ko-Fc in Kombination mit α IgM, eine erhöhte Proliferationsrate. Auch die alleinige Inkubation mit α IgM, α CD40, löslichem CEACAM8 und Ko-Fc zeigte gegenüber der Kontrolle probandenabhängig eine tendenziell erhöhte Proliferation.

Ähnlich uneinheitlich präsentierten sich auch die Daten der T-Zell-Proliferation (Abb. 24). Die für 4 Tage in reinem Zellmedium kultivierten Kontrollzellen ähnelten in ihrer Reaktion auf lösliches CEACAM8 den naiven nicht-monozytenfreien Zellen (Abb. 22, graue Balken). Eine erhöhte Proliferationsrate war bereits durch die reine Inkubation der Zellen mit α CD3 zu beobachten, die durch die Kombination mit dem Kostimulus α CD28 bzw. CEACAM8-Fc nur minimal erhöht werden konnte. Ko-Fc in Kombination mit α CD3 zeigte ebenfalls eine unerwartet hohe Proliferationsrate.

Die Reaktion der IL2-stimulierten PBMCs auf die T-Zell-spezifischen Stimuli erwies sich als noch heterogener. Bereits die mitgeführten Bezugskontrolle (Ko) zeigte probandenabhängig relativ hohe Proliferationsraten, was auf einen generell erhöhten Aktivitätszustand der Zellen hinwies. α CD3 und α CD28 alleine führten zu ähnlich hohen Proliferationsraten wie deren Kombination oder die Inkubation von α CD3 mit löslichem CEACAM8 bzw. Ko-Fc.

Insgesamt präsentierten sich somit die Daten der Kontrollzellen sowie der IL2-stimulierten PBMCs für T- und B-Zellen als sehr uneinheitlich. Im Gegensatz zu naiven B- und T-Zellen zeigte lösliches CEACAM8 bei aktivierten PBMCs keinen kostimulatorischen Effekt mehr. Ein direkter inhibitorischer Effekt auf aktivierte Zellen konnte allerdings auch nicht gezeigt werden. Eine konkretere Aussage zum Effekt der CEACAM8-vermittelten CEACAM1-Ligation war auf Grund der Heterogenität der Daten somit nicht abzuleiten. Da bereits die nicht stimulierten Kontrollzellen (Ko Tag 4) ein anderes Proliferationsmuster im Vergleich zu den naiven PBMCs zeigten, war die Heterogenität der Daten zu einem Großteil direkt auf die Heterogenität des PBMC-Testsystems durch die Kokultivierung unterschiedlicher zellulärer Subpopulationen zurückzuführen. Auf Grund zellulärer Interaktionen über direkten Zellkontakt oder vermittelt über die Ausschüttung

von Zytokinen war eine komplexe Beeinflussung des zellulären Reaktionsmusters nicht auszuschließen. Durch den Einsatz pleiotrop wirkender Zytokine wurde die Komplexität des Testsystems zusätzlich verstärkt.

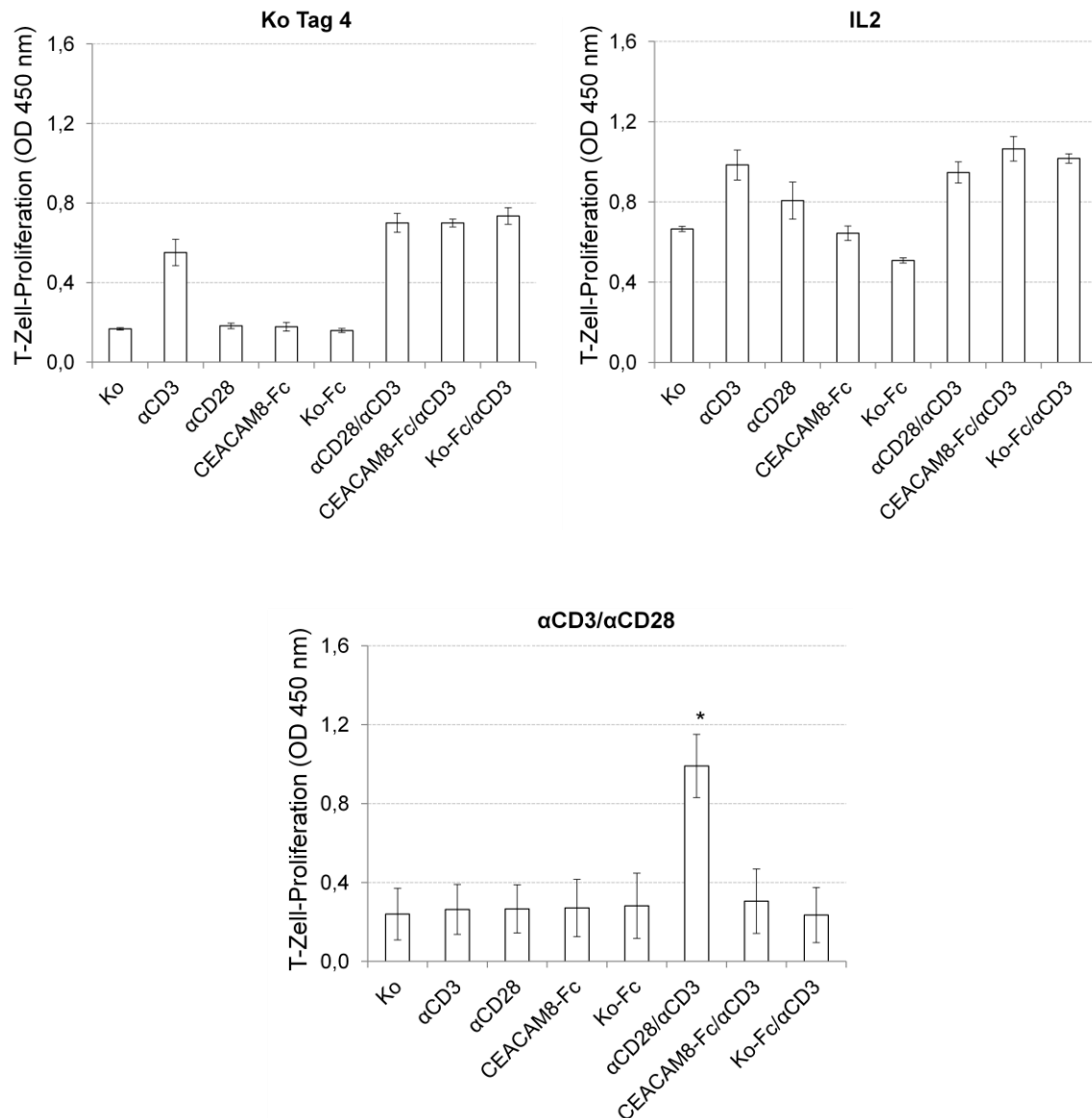


Abbildung 24 : Effekt von löslichem CEACAM8 auf die T-Zell-Proliferation in zuvor aktivierten, monozytenfreien PBMCs. Frisch isolierte monozytenfreie PBMCs wurden für 4 Tage mit IL2, αCD3/αCD28 oder in Zellmedium (Ko Tag 4) inkubiert und danach erneut für 4 Tage mit T-Zell-spezifischen Ak (αCD3, αCD28), in Kombination mit CEACAM8-Fc und Ko-Fc inkubiert. Über den Einbau von BrdU in die zelluläre DNA, wurde die Proliferationsrate am 4. Tag der Restimulation bestimmt. Die Messungen erfolgten als Triplikate. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert (OD = 450 nm) ± Standardabweichung. Die Daten zeigen vier unabhängige Versuche mit unterschiedlichen Probanden (n = 4 *, p < 0,05 im Vergleich mit αCD3-stimulierten Zellen).

In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen zeigten die zuvor mit α CD3/ α CD28 stimulierten PBMCs deutlich einheitlichere Ergebnisse mit signifikanten Unterschieden bezüglich ihrer Restimulation (Abb. 24, unten). Wie zuvor beschrieben (Abb. 12) führte eine viertägige Inkubation frisch isolierter PBMCs mit α CD3/ α CD28 zu einer 97% reinen T-Zell-Population und somit zu einem weitaus homogenen Testsystem als die Stimulation mit IL2. Auf erneute Stimulation reagierten die T-Zellen nur auf die Kombination von α CD3/ α CD28 mit einer deutlichen Zunahme ihrer Prolifertaion. Der bei naiven Zellen beobachtete kostimulatorische Effekt des löslichen CEACAM8 blieb gänzlich aus. Diese Ergebnisse konnten, für alle Probanden gleichförmig, wiederholt gezeigt werden. Somit scheinen T-Zellen nach Aktivierung durch das klassische Stimuluspaar α CD3/ α CD28 nicht mehr zugänglich für stimulatorische Signale durch CEACAM8-vermittelte Bindung an CEACAM1 zu sein.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass aktivierungsinduzierte Veränderungen der Lymphozyten *in vitro* zu einer Modifikation der zellulären Reaktion auf CEACAM1-vermittelte Signalkaskaden führen. Auf Grund der Komplexität der durch Stimulation initiierten Veränderungen ist nicht abschließend zu klären, welche Mechanismen genau hierfür verantwortlich sind. Jedoch sollte die in dieser Arbeit gezeigte Veränderung des CEACAM1-Expressionsmusters und die Induktion eines weiteren potentiell regulatorischen CEACAM-Mitgliedes (CEACAM6) zur Klärung dieser Frage nicht unbeachtet bleiben.

4. DISKUSSION

Die Aktivität sowohl der adaptiven, als auch der angeborenen zellulären Abwehr basiert auf der Verarbeitung positiver und negativer Signale. Bisher konnte eine Vielzahl von zellulären Rezeptoren identifiziert werden, die das Immunsystem auf komplexe Weise beeinflussen. Dabei ist die Rolle von CEACAM1 als Regulator der Immunzellfunktion erst seit kurzem Gegenstand der Forschung. In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir die wichtige Funktion von CEACAM1 im Rahmen einer Immunantwort durch dessen aktivierungsinduzierte Hochregulation auf humanen PBMCs bestätigen. Zudem fanden wir, dass stimulierte Zellen neben der langen zytoplasmatischen CEACAM1-Isoform auch die kurzen zytoplasmatischen CEACAM1-Isoformen exprimieren und dass eine Aktivierung von Lymphozyten neben der Hochregulation von CEACAM1 auch zur Induktion der CEACAM6-Expression auf PBMCs führt. Des Weiteren charakterisierten wir das von Granulozyten sekretierte lösliche CEACAM8, ein physiologischer Ligand von CEACAM1, als potenten Kostimulator der BZR-vermittelten Zellaktivierung. Dieser Effekt konnte auch für naive T-Zellen gezeigt werden. Interessanterweise konnten wir aber zeigen, dass lösliches CEACAM8 auf zuvor durch Zytokine aktivierte PBMCs keinen kostimulatorischen Effekt mehr hat.

4.1 IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 als potente Induktoren der CEACAM1- und CEACAM6-Expression in PBMCs

Eine Hochregulation der CEACAM1-Expression durch IL2, IL7 und α CD3/ α CD28 wurde prinzipiell bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Kammerer et al., 1998; Boulton und Gray-Owen, 2002; Gray-Owen und Blumberg, 2006). Auch diese Arbeit konnte die obigen Zytokine als potente Auslöser der CEACAM1-Expression bestätigen und zudem herausstellen, dass dieselben Stimuli ebenso zu einer zuverlässigen Induktion der CEACAM6-Expression führen (3.3). Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Hochregulation der CEACAM1- und CEACAM6-Expression durch Zytokine ein physiologisches Ereignis im Rahmen der Lymphozytenaktivierung darstellt. IL2 wird als eines der ersten Zytokine bereits von naiven T-Helferzellen (T_{H0} -Zellen) nach Erkennung ihres Antigens sezerniert und steuert deren Proliferation sowie Differenzierung in T_{H1} - und T_{H2} -Effektorzellen (Janeway et al., 2002). Gleichzeitig wirkt es auch als Aktivierungsfaktor auf andere Lymphozyten und stimuliert diese zur Ausschüttung

weiterer Zytokine. IL7 reguliert die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu lymphoiden Progenitorzellen sowie die differenziertere Reifung der einzelnen Subpopulationen zu B- und T-Zellen (Janeway et al., 2002). Durch Stimulation des TZR/CD3-Komplexes zusammen mit CD28 werden Signalkaskaden angestoßen, die wiederum zu einer vermehrten Produktion und Ausschüttung von IL2 führen (Janeway et al. 2002).

Während in der durchflusszytometrischen Analyse alle drei Stimuli zu einer deutlichen Hochregulation der basalen CEACAM1- und CEACAM6-Expression auf der T- und B-Zelloberfläche führten (Abb. 14 u. 16), fielen die CEACAM-Proteinbanden im Western Blot für die α CD3/ α CD28-stimulierten Zellen jeweils schwächer aus (Abb. 18). Hier kann in Erwägung gezogen werden, dass die Verwendung FITC-gekoppelter Antikörper im FACS ein Risiko für falsch hohe Fluoreszenzen birgt, möglicherweise durch unspezifische Anhaftung von überschüssigem, nicht effizient gekoppeltem FITC an die Zellen. Beachtet man aber die für Granulozyten beschriebene Speicherung verschiedener CEACAMs in intrazellulären Vesikeln (Kuroki et al., 1992), lassen sich die im Western Blot detektierten stärkeren Banden der IL2- und IL7-stimulierten Zellen möglicherweise auf größere Mengen an intrazellulär vorhandenem CEACAM zurückführen. So ist nicht ausgeschlossen, dass IL2 und IL7 über die Auslösung spezifischer Signalkaskaden zu einer vermehrten intrazellulären Speicherung von CEACAM1 und CEACAM6 führen, während die Hochregulation in α CD3/ α CD28-stimulierten Zellen auf die Zelloberfläche beschränkt bleibt. Hinweise auf die unterschiedliche Qualität der Zellstimulation von Zytokinen und α CD3/ α CD28 liefern die in Kapitel 3.2 beschriebenen Ergebnisse: Obwohl auch die CD3/CD28-Stimulation zu einer IL2 Sekretion führt, scheint dies einen anderen Effekt auf die Zellen zu haben als die alleinige Stimulation mit IL2 bzw. IL7. In diesem Zusammenhang sollte beachtet werden, dass die hier beschriebenen Erhöhungen im CEACAM-Expressionsmuster als indirekte Zytokineffekte interpretiert werden müssen. Sie können nicht direkt auf die spezifische Wirkung der Stimulanzen im Einzelnen zurückgeführt werden, da sich die CEACAM-Expression erst ab Tag 3 nach Stimulation zu erhöhen beginnt (Abb. 16 u. 17). Würden die Stimulanzen direkt die Neosynthese von CEACAM1 und CEACAM6 induzieren, so wäre eine erhöhte Expression bereits nach spätestens 24 Stunden zu erwarten. Auch andere Arbeitsgruppen konnten einen Anstieg der CEACAM1-Expression auf stimulierten PBMCs erst nach mehreren Tagen beobachten (Boulton und Gray Owen, 2002; Chen und Shively, 2004; Donda et al., 2000). Pantelic et

al. zeigten sogar, dass isolierte IL2-stimulierte B-Zellen nur sehr geringe Mengen an CEACAM1 exprimierten, während eine IL2-Stimulation in Anwesenheit anderer mononukleärer Zellen (PBMCs) zu einer deutlichen Hochregulation der CEACAM1-Expression führte (Pantelic et al., 2005). Somit erwies sich IL2 zwar als notwendiger, aber nicht ausreichender Induktor der CEACAM1-Expression auf B-Zellen. IL2 bzw. IL7 können folglich nicht allein die direkten Effektoren sein, sondern geben offensichtlich den Anstoß für bestimmte Signaltransduktionskaskaden, die wiederum zu Zytokinausschüttungen führen. Dies löst wiederum Signale aus, die dann nach 3-4 Tagen zu einer Neosynthese von CEACAMs und deren erhöhter Zell-Expression führen.

Pantelics Beobachtungen bestätigen außerdem die Bedeutung zytokinabhängiger Interaktionen für die Hochregulation von CEACAM1 und CEACAM6 durch Kokultivierung unterschiedlicher Subpopulationen. Vor diesem Hintergrund wurde auf die Isolierung einzelner Zelllinien im Zusammenhang mit der hier zu beantwortenden Fragestellung verzichtet. Um möglichst der *in vivo* Situation nahe Daten zur CEACAM1-Funktion in peripheren Lymphozyten eines gesunden Modellorganismus zu erhalten, wurden alle Versuche mit PBMC-Kulturen durchgeführt, die in der Verteilung ihrer Subpopulation den aus der Literatur bekannten Daten entsprachen (Abb. 9).

Selbst bei ordnungsgemäßer Durchführung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und wiederholter Überschichtung der isolierten PBMCs über Ficoll, konnte eine geringe Kontamination der frisch isolierten mononukleären Zellen mit Granulozyten nie ganz verhindert werden. Diese Problematik lässt sich durch die Existenz einer anteilig kleinen Menge an *low-density* Granulozyten erklären (Berends et al., 1994). Diese lassen sich auf Grund ihrer PBMC-ähnlichen Dichte mittels herkömmlicher Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nicht suffizient von den mononukleären Zellen separieren. Dies spielt vor allem für die Auswertung der CEACAM-Expression im Western Blot (3.3.3) und der RT-PCR (3.3.4) eine Rolle. Im Western Blot stammten die starken CEACAM-Banden der Ko Tag 0 von noch vitalen Granulozyten (Abb. 18). Auch die in der RT-PCR detektierten CEACAM-6 und CEACAM1-Isoform-Banden der Ko Tag 0 lassen sich auf Kontamination mit PMN zurückführen, da CEACAM8, welches ausschließlich auf Granulozyten vorkommt, hier nachweisbar war (Abb. 19). Als sehr kurzlebige Zellen sterben Granulozyten jedoch spätestens nach 24 Stunden durch Apoptose, daher war CEACAM8 in den Tag 4 Proben nicht mehr zu detektieren.

4.2 CEACAM6-Induktion und CEACAM1-Isoformexpression

Obwohl die Existenz von CEACAM6 auf Lymphozyten bisher kontrovers diskutiert wurde, konnten wir in dieser Arbeit feststellen, dass aktivierte PBMCs CEACAM6 auf ihrer Oberfläche exprimieren (3.3). Hierbei konnte die Expression wiederholt durch unterschiedliche methodische Ansätze (Durchflusszytometrie, Western Blot, RT-PCR) bestätigt werden. Zudem zeigten die Ergebnisse eine parallel zur CEACAM1-Expression verlaufende Erhöhung der CEACAM6-Expression (vgl. Abb. 15 und Abb. 17). Dies weist auf dessen potentielle Rolle als wichtiges CEACAM1-Komolekül hin. Vor dem Hintergrund der für Granulozyten und Epithelzellen beschriebenen regulatorischen Funktion von CEACAM6 (1.4) eröffnet die Koexpression dieses weiteren CEACAM-Mitgliedes neue Perspektiven in der Analyse der CEACAM1-vermittelten Effekte auf Lymphozyten. Das Ausmaß der CEACAM6-Induktion war allerdings probandenabhängigen Schwankungen unterworfen. Dies mag zum einen auf probandenspezifische Unterschiede in der relativen Zusammensetzung der PBMC-Subpopulationen zurückzuführen sein. Zum anderen bietet der unterschiedliche *Priming*-Zustand des jeweiligen *in vivo* Systems, aus dem die Zellen isoliert wurden, eine mögliche Erklärung. So zeigte eine genauere Analyse des Probandenkollektivs, dass vor allem starke Raucher oder Probanden mit einer durchgemachten leichten Erkältung eine deutlich stärkere Induktion der CEACAM6-Expression aufwiesen. Bekannt ist, dass Rauchen die Funktion des Immunsystems beeinflusst und zu einem erhöhten Niveau an chronischen Entzündungen führt. Während einige Arbeitsgruppen die Existenz von weiteren CEACAM-Mitgliedern auf Lymphozyten zurückweisen (Kammerer et al., 1998; Gray Owen und Blumberg, 2006), liefern die obigen Überlegungen eine mögliche Erklärung dafür, warum bisher nur eine Studie die Expression von CEACAM6 auf peripheren humanen T- und B-Zellen zeigen konnte (Singer et al., 2002).

Für Epithelzellen ist bekannt, dass auch das Verhältnis der CEACAM1-Isoformen eine wichtige Rolle in der Regulation der CEACAM1-vermittelten Effekte spielt (1.3.1). Das Isoformenexpressionsmuster auf humanen Lymphozyten ist bisher umstritten. Daher ist die in dieser Arbeit gezeigte Expression der kurzen Isoformen auf IL2-, IL7- und α CD3/ α CD28-stimulierten PBMCs möglicherweise von funktioneller Bedeutung für zukünftige Betrachtungen der Rolle von CEACAM1 als Effektor der Lymphozytenfunktion. Einen Hinweis für einen möglichen funktionellen Unterschied zwischen der kurzen und langen Isoform in Lymphozyten lieferte eine Studie an Jurkat T-

Zellen. Chen et al. postulierten, dass eine Transfektion mit CEACAM1-3S zu einer deutlichen Kostimulation der TZR-abhängigen Zellaktivierung führt, während die Expression von CEACAM1-3L die T-Zellen inhibierte (Chen et al., 2004). Auch Müller et al. wiesen auf die entscheidende Rolle des CEACAM1-L/CEACAM1-S Verhältnisses in der Regulation intrazellulärer Signalkaskaden in murinen Epithelzellen hin (Müller et al., 2009a). So scheint die supramolekulare Organisation von CEACAM1-L als Monomer oder Dimer zu bestimmen, ob und in welchem Ausmaß eine Rekrutierung von wichtigen Signalmolekülen bzw. Phosphatasen (SHP-1, SHP-2) an die lange zytoplasmatische Domäne erfolgt. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass L/L-Homodimere die SHP-2-Bindung effizienter stabilisierten als CEACAM1-L-Monomere oder gar L/S-Dimere. Da die L- und die S-Form Heterodimere bilden, führt eine Koexpression von CEACAM1-S bei konstanter Menge an CEACAM1-L zu einer verringerten Bildung von CEACAM1-L-Homodimeren. Dies hat wiederum Einfluss auf die zytoplasmatischen Signalwege (Müller et al. 2009a). Die Koexpression der kurzen zytoplasmatischen CEACAM1-Isoform und das L/S-Isoformenverhältnis auf Lymphozyten ist daher ein wichtiger Regulator des Monomer/Dimer Status und somit eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte des CEACAM1 als inhibitorischer und stimulatorischer Rezeptor.

Mittels RT-PCR und unter Verwendung Isoformen-spezifischer Primer, wurde in dieser Arbeit der Nachweis sowohl der kurzen als auch der langen Splice-Variante geleistet. Bei der Etablierung einer Isotyp-spezifischen RT-PCR für CEACAM1 ergibt sich folgendes Problem: Es gibt zwar Primer die ausschließlich die lange Isoformvariante von CEACAM1 binden, für die kurze Isoform muss man sich jedoch einer Sequenzstruktur bedienen, die zumindest zum Teil auch in der langen Version zu finden ist (2.1.6). Deshalb muss man in einer solchen PCR kontrollieren, ob das für die kurze CEACAM1-Variante spezifische Primer-Paar potentiell auch die lange Variante amplifiziert. Nur so kann man falsch positive Ergebnisse für die kurze CEACAM1-Version durch fälschliche Amplifikation der langen Isoform ausschließen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden für die RT-PCR die in 2.1.6 aufgelisteten Primer und das PCR-Protokoll aus 2.2.4.3 verwendet. Diese hatten zuvor diverse Kontroll-PCRs entsprechend erfolgreich passiert.

Grenzen in der Beurteilung der absoluten Expressionsstärke der einzelnen Splice-Varianten ergeben sich dadurch, dass mittels einfacher PCR nicht die genauen Mengen an mRNA der jeweiligen Isoform bestimmt werden können. Eine Möglichkeit der Quantifizierung bietet die *real-time* PCR, bei der durch Messung von Fluoreszenzsignalen

während der exponentiellen Phase der Amplifikation die Menge an PCR-Produkten bestimmt wird.

4.3 Membranständiges CEACAM1 ist ein wichtiges Regulatormolekül lymphozytärer Funktionen

Die Funktion von humanem CEACAM1 als Regulatormolekül der lymphozytären Immunantwort, vor allem für B-Zellen, wird immer noch kontrovers diskutiert. Bisher konnten noch keine abschließenden Erkenntnisse dazu gewonnen werden. Diese Arbeit präsentiert CEACAM1 als einen potenten Kostimulus der BZR- und TZR-vermittelten Zellaktivierung naiver Lymphozyten (3.4). Lösliches CEACAM8, als physiologischer CEACAM1-Ligand, in Kombination mit BZR-vernetzendem α IgM resultierte in einer starken Stimulation der B-Zell-Proliferation (3.4.1). Gleiches konnte auch in Kombination mit α CD3 für T-Zellen gezeigt werden (3.4.2). Die anfänglich inhomogenen Ergebnisse frisch isolierter PBMCs, mit hohen Proliferationsraten auch der Isotypkontrollen (Ko-Fc) (Abb. 20), konnten primär auf die Anwesenheit von Monozyten im Testsystem zurückgeführt werden. Während die Expression von Fc-Rezeptoren (FcR) auf T-Zellen umstritten ist und B-Zellen nur den inhibitorischen Rezeptor Fc γ RIIB exprimieren, zeigen Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und Granulozyten eine große Bandbreite stimulierender und inhibierender FcR (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Durch die Anwesenheit einer Fc-Domäne bei dem durch Transfektion synthetisierten CEACAM8-Fc und Ko-Fc (CEACAM1dN-Fc) ergab sich die mögliche Interaktion mit FcR-exprimierenden Monozyten. Diese reagieren auf Bindung ihrer Fc-Rezeptoren mit einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL6, IL8 oder TNF α . Als wichtige Wachstums- und Aktivierungsfaktoren stimulieren diese Stoffe wiederum die Proliferation anderer Immunzellen (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Dieser Effekt spiegelte sich in den erhöhten Proliferationsraten der mit Ko-Fc inkubierten nicht-monozytenfreien PBMCs wieder. Diese Beobachtung war allerdings nach Monozytenisolation nicht mehr nachzuweisen. Konsequenterweise mussten die weiteren Analysen mit Monozyten-depletierten PBMCs durchgeführt werden.

Eine Herausforderung für die Klärung der CEACAM1-Funktion auf Lymphozyten ist, dass bisher sowohl positive als auch negative proliferative Effekte für T- und B-Zellen beschrieben wurden (1.3.2.4). Ungeklärt bleibt, welche Faktoren letztendlich für die

unterschiedlichen Beobachtungen eine Rolle spielen. Zu bemerken ist, dass das Vorhandensein zweier ITIM Domänen keine ausreichende Begründung für eine strikte Einordnung des CEACAM1 in die Gruppe der inhibitorischen Rezeptoren darstellt. Auch andere ITIM-tragende Oberflächenmoleküle, wie beispielsweise CD22, scheinen grundsätzlich in der Lage zu sein, positive Signale zu vermitteln (Poe et al., 2004). Die Diskrepanz zwischen dem von uns beschriebenen kostimulatorischen Effekt des CEACAM1 und den bisher postulierten inhibitorischen Effekten auf T- und B-Zellen mag unterschiedliche Gründe haben. So wurden die Daten zur inhibitorischen Funktion an Zellen anderer Spezies wie Maus-Zellen (Nakajima et al., 2002), DT40 Hühner B-Zellen (Chen et al., 2001) oder an transformierten humanen Zelllinien wie Daudi B-Zellen (Lobo et al., 2009) und Jurkat T-Zellen (Chen und Shively, 2004; Chen et al., 2004) erhoben. Eine Übertragung der in Vogelzellen (DT40) erlangten Daten bleibt sehr fragwürdig, zumal eine CEACAM-Expression auf normalen Vogelzellen bisher noch nicht beschrieben wurde. Zudem sind die speziesspezifischen Unterschiede der exprimierten CEACAMs so heterogen, dass hier Vorsicht bei der Übertragung der Resultate auf den Menschen geboten ist. Fraglich bleibt außerdem, in wie weit transformierte humane Zellen die Funktion normaler Immunzellen *in vivo* widerspiegeln. Andere Arbeiten verwendeten ausschließlich isolierte T- bzw. B-Zellen (Pantelic et al., 2005; Boulton und Gray-Owen, 2002). Wie schon für die zytokinvermittelten Effekte diskutiert (4.1), verhalten sich isolierte Zellen möglicherweise anders als eine PBMC-Suspension *in vitro*. So beschrieben Boulton und Gray-Owen (2002) in ihrer Arbeit mit aufgereinigten CD4+ T-Zellen eine Hemmung der Proliferation durch Bindung CEACAM1-spezifischer Opa-Proteine. Andere Studien mit frisch isolierten PBMCs zeigten allerdings, konkordant zu den Ergebnissen dieser Arbeit, eine starke Induktion der T-Zell-Proliferation durch Inkubation mit Opa-Protein (Sadarangani et al., 2011). Des Weiteren wurden hauptsächlich Zellen verwendet, die zuvor mit IL2, α CD3/ α CD28 oder anderen Stimuli zwecks einer Hochregulation der CEACAM1-Expression stimuliert worden waren (Nakajima et al., 2002; Boulton und Gray-Owen, 2002; Chen und Shively, 2004; Pantelic et al., 2005). Ein Einwand ist hier der mögliche Unterschied im Reaktionsverhalten von aktivierten Lymphozyten gegenüber naiven Zellen. Diese Problematik war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Einen Hinweis hierfür liefert beispielsweise eine Studie zum Effekt der Opa-Protein-vermittelten CEACAM1-Bindung auf humanen B-Zellen (Pantelic et al., 2005). Während Opa-Protein die Antikörperproduktion in IL2-behandelten B-Zellen hemmte und zu vermehrter

Apoptose führte, reagierten naive Zellen nicht mit einer Inhibition, sondern zeigten sogar eine geringe Stimulation ihrer Antikörperproduktion. Auch Greicius et al. zeigten für murine naive B-Zellen durch AK-Bindung an CEACAM1 eine BZR-abhängige Kostimulation der Zellproliferation, eine Zunahme der Antikörpersekretion und eine verstärkte Adhäsion der Zellen untereinander (Greicius et al., 2003). Interessanterweise konnte auch die vorliegende Arbeit zeigen, dass aktivierungsinduzierte Veränderungen der Lymphozyten *in vitro* zu einer Modifikation der zellulären Reaktion auf CEACAM1-Ligation führen: Der für naive Zellen eindeutig gezeigte kostimulatorische Effekt des löslichen CEACAM8 konnte für stimulierte Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Besonders deutlich zeigte sich diese Beobachtung an α CD3/ α CD28 stimulierten PBMCs (Abb. 24). Diese bestanden nach 4-tägiger Stimulation mit α CD3/ α CD28 aus einer sehr homogenen, 97 % reinen T-Zell-Population (Abb. 12). Die zytokinstimulierten PBMCs präsentierten sich hinsichtlich ihrer Reaktion gegenüber Restimulation mit TZR- bzw. BZR-spezifischen Stimuli als eher heterogen. Diese Beobachtung weist somit auf die Grenzen des gewählten PBMC-Testsystems zur Klärung der genauen CEACAM1-Funktion auf aktivierten Lymphozyten hin. Durch die Kokultivierung unterschiedlicher Subpopulationen *in vitro* ergeben sich multiple Interaktionsmöglichkeiten, die wiederum das Reaktionsverhalten der Zellen gegenüber bestimmten Stimuli auf vielfältige Weise beeinflussen können. Einen Hinweis dafür, dass bereits die alleinige Inkubation der PBMCs in Medium nach 4 Tagen zu einer Veränderung der Zellen führt, gibt die in 3.3.2 beschriebene leichte Induktion der CEACAM6-Expression auf unstimulierten Kontrollzellen. Auch eine Induktion anderer regulatorischer Oberflächenmoleküle ist vor diesem Hintergrund denkbar. Wie bereits für die nicht-monozytenfreien naiven PBMCs diskutiert, stellt die Hochregulation von Fc-Rezeptoren eine mögliche Erklärung für die deutlich erhöhten Proliferationsraten der Fc-Kontrollen in Kombination mit α IgM bzw. α CD3 dar. Auch α CD3 alleine führte bei IL2-stimulierten PBMCs und den unstimulierten Kontrollzellen zu einer Induktion der T-Zell-Proliferation. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass auch α CD3 allein in der Lage ist, in Abhängigkeit von dessen Konzentration und der allgemeinen Empfindlichkeit der Zellen, diese auch ohne Kostimulus zu aktivieren. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Titrations zur Ermittlung der optimal zu verwendenden α CD3 Konzentration durchgeführt. Höhere Konzentrationen von α CD3 führten bereits zu einem erheblichen Anstieg der Zellproliferation. Auf Grund eines veränderten Rezeptorstatus oder der Hochregulation intrazellulärer Effektormoleküle sind

die in einem heterogenen System kultivierten Zellen möglicherweise empfindlicher gegenüber α CD3.

Während also α CD3/ α CD28 spezifisch die T-Zellen aktiviert, beeinflussen IL2 und IL7 durch ihre pleiotropen Effekte auf unterschiedliche Zellen das PBMC-Testsystem auf viel komplexere Art und Weise. Ein verändertes Expressionsmuster von regulatorischen Rezeptoren oder die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden sind mögliche Konsequenzen und bieten eine Erklärung für die Heterogenität der Daten.

Für Epithelzellen wurde gezeigt, dass auch das CEACAM1-Expressionslevel und dessen Isoformenverhältnis, der Aktivierungszustand der Zelle, das Gleichgewicht zwischen Dimeren und Monomeren, sowie die Interaktion zwischen unterschiedlichen CEACAM-Mitgliedern scheinbar eine zentrale Rolle in der Feinregulation der CEACAM1-vermittelten Effekte spielt (1.3). So beschrieben beispielsweise auch Singer et al., dass der bei Epithelzellen zu beobachtende Unterschied des L/S-Isoformenverhältnisses zwischen ruhenden und proliferierenden Zellen einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation hat (Singer et al., 2000; Singer et al., 2010). Vor diesem Hintergrund ist die in dieser Arbeit beschriebene Koexpression der kurzen und langen CEACAM1-Isoformen sowie von CEACAM6 auf der Oberfläche von (aktivierten) Lymphozyten von großer Bedeutung. Die Beobachtung, dass aktivierte Lymphozyten auf lösliches CEACAM8 nicht mehr mit einer Kostimulation reagieren, lässt sich somit möglicherweise auf das durch Zytokine veränderte CEACAM-Expressionsmuster zurückführen. Die Tatsache, dass lösliches CEACAM8 ebenso an CEACAM6 bindet, wenn auch mit einer wesentlich geringeren Affinität als für CEACAM1 beschrieben (Singer et al., unveröffentlichte Daten), liefert einen weiteren Erklärungsansatz für eine möglicherweise modifizierte Reaktion von aktivierten, CEACAM6-exprimierenden Zellen auf diesen physiologischen Liganden. Mögliche Wechselwirkungen zwischen CEACAM6 und CEACAM1 sowie die Funktion der unterschiedlichen Splice-Varianten sollten daher für zukünftige Analysen der CEACAM-Funktion auf Lymphozyten Beachtung finden.

4.4 Die Bedeutung von löslichem CEACAM8 als physiologischer CEACAM1-Ligand

In dieser Arbeit konnte lösliches CEACAM8 erstmalig als ein neuer potenter Effektor der erworbenen Immunantwort identifiziert werden. Alle bisher postulierten Erkenntnisse zur CEACAM1-Funktion wurden überwiegend mittels CEACAM1-spezifischer monoklonaler Antikörper gewonnen, die den potentiellen Liganden ersetzen sollten (Lobo et al., 2009; Nakajima et al., 2002; Chen et al., 2001; Chen und Shively, 2004). Signalübertragung durch antikörpervermittelte Ligation stellt jedoch nicht unbedingt ein physiologisches Ereignis dar und eine mögliche Blockade von kostimulatorischen Signalen durch die verwendeten Antikörper ist nicht gänzlich auszuschließen. Prinzipiell können Antikörper antagonistisch oder agonistisch wirken. Für solch eine Zuordnung der Antikörper muss jedoch bekannt sein, wie ein physiologischer Ligand wirkt. Vor diesem Hintergrund ist die erstmalige Verwendung eines physiologischen CEACAM1-Liganden ein bedeutender Schritt in der Analyse der natürlichen Funktion dieses Adhäsionsrezeptors. *In vitro* wird lösliches CEACAM8 von Granulozyten durch fMLP, IFN γ und weitere Stimulanzen ausgeschüttet (Zhao et al., 2004; Singer et al., unveröffentlichte Daten). Seine potentiell wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems wird dadurch deutlich, dass auch *in vivo* erhöhte Mengen an CEACAM8 in Granulozyten bei Patienten mit bakteriellen Infektionen, Influenza, und Wundheilungsprozessen nachgewiesen werden können (Zhao et al., 2004; Singer et al., unveröffentlichte Daten). Als Teil der angeborenen Immunantwort sind Granulozyten normalerweise für die umgehende Verteidigung des Organismus vor Bakterien, Pilzen und Parasiten zuständig. Durch die Ausschüttung von CEACAM8 rekrutieren Granulozyten möglicherweise als vorderste Verteidigungsfront der frühen Immunantwort die in dieser Phase noch naiven Lymphozyten. Durch die Kostimulation der T- und B-Zell-Proliferation mittels CEACAM8 wird die erfolgreiche Antwort des adaptiven Immunsystems vorbereitet, das erst nach 3-4 Tagen zum Zuge kommt, wenn die Erreger die erste Abwehrlinie durchbrochen haben. Welche Rolle löslichem CEACAM8 in der späten Phase einer Immunantwort zukommt, bleibt weiterhin zu untersuchen. Hinweise liefern die Ergebnisse dieser Arbeit mit zuvor für 4 Tage aktivierten Lymphozyten, die auf CEACAM8 nicht mehr mit einer deutlichen Koinduktion ihrer Proliferation reagieren. Andere Studien zeigten sogar eine Inhibition und vermehrte Apoptose von zuvor aktivierten T- und B-Zellen durch CEACAM1-Antikörper (Lobo et al., 2009; Nakajima et al., 2002; Chen et al., 2002; Chen und Shively, 2004). In

Verbindung mit diesen Beobachtungen, kann lösliches CEACAM8 in einer späteren Phase der Immunsystem-Aktivierung möglicherweise vor einer überschießenden Immunantwort schützen. Ein denkbarer Mechanismus ist hier der aktivierungsinduzierte Zell-Tod. Durch die vermehrte CEACAM1-Expression auf ohnehin schon aktivierten Lymphozyten führt die Bindung von kostimulatorischem, löslichem CEACAM8 möglicherweise zu einer Überstimulation, gefolgt von einer erhöhten Rate an aktivierungsinduziertem Zell-Tod der Lymphozyten.

CEACAM8 zeichnet sich gegenüber anderen löslichen CEACAM-Varianten durch einige Eigenschaften aus, die sich im Rahmen einer Immunreaktion als deutliche Vorteile erweisen. Somit wird die Rolle dieses CEACAM1-Liganden als Modulator der Immunzellfunktion zusätzlich betont. Hierbei unterscheidet sich lösliches CEACAM8 beispielsweise vom CEACAM1. Exprimiert auf der Oberfläche anderer Immunzellen, ist CEACAM1 als *trans*-homophiler Adhäsionsrezeptor (Abb. 5) möglicherweise in der Lage, die Signaltransduktion der gebundenen Partnerzellen zu initiieren. Sekretiert von Granulozyten (Kuroki et al., 1992) im Rahmen einer Immunreaktion würde sich lösliches CEACAM1 jedoch gegenseitig binden und somit inaktivieren. Dieses Problem ergibt sich nicht für CEACAM8, da es im Gegensatz zu CEACAM1 keine homophilen Bindungen eingeht (Singer et al., unveröffentlichte Daten). Des Weiteren ist im Vergleich zu anderen CEACAMs bisher kein Pathogen bekannt, dass von CEACAM8 gebunden wird (Gray-Owen und Blumberg, 2006). Somit bleibt CEACAM8 auch in Anwesenheit von Erregern frei für die Bindung an seine Zielzellen, während die anderen pathogen-bindenden CEACAM-Mitglieder möglicherweise durch erregerspezifische Bindung abgefangen und inaktiviert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Versuchsergebnisse identifizieren somit erstmalig lösliches CEACAM8 als einen neuen potenten Effektor der Immunantwort. Weiterführende Untersuchungen sind nötig um dessen potentielle Rolle in der Regulation und Pathogenese von Entzündungsreaktionen, Immunerkrankungen und Wundheilungsstörungen *in vivo* zu klären. Unter Voraussetzung weiterer Erkenntnisse auf diesem Gebiet öffnen sich zusätzliche Perspektiven für neue pharmakologische Interventionsmöglichkeiten immunologisch bedingter Erkrankungen. Die Eigenschaften des löslichen CEACAM8 als physiologisches Produkt mit geringem Nebenwirkungspotential machen es besonders attraktiv als potentiellen Wirkstoff neuer Immuntherapeutika.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein gut funktionierendes Immunsystem basiert auf der Verarbeitung positiver und negativer Signale. Durch Zytokine und Zell-Zell-Interaktion über spezifische Oberflächenrezeptoren wird dieses System auf komplexe Art und Weise reguliert. Die *carcinoembryonic-antigen-related cell-adhesion molecules* (CEACAMs) repräsentieren eine Gruppe von multifunktionellen Adhäsionsrezeptoren, die erst in den vergangenen Jahren als Modulatoren der Immunzellfunktion an Aufmerksamkeit gewonnen haben. Jedoch wird die Rolle von CEACAM1, dem Gründermolekül dieser Proteinfamilie, als Regulator der T- und B-Zell-Funktion kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit konnten wir die bereits beschriebene aktivierungsinduzierte Hochregulation von CEACAM1 auf der Oberfläche humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) durch Interleukin 2, Interleukin 7 und anti-CD3/anti-CD28 bestätigen. Ergänzend zeigten wir, dass aktivierte Zellen neben der langen (L) zytoplasmatischen Isoformvariante auch kurze (S) zytoplasmatische Isoformen von CEACAM1-4 bzw. CEACAM1-3 exprimierten. Des Weiteren konnten wir nachweisen, dass aktivierte PBMCs neben CEACAM1 auch eine signifikante CEACAM6-Expression aufweisen. Da für Epithelzellen eine Modulation der CEACAM1-vermittelten Signale durch das L/S-Isoformenverhältnis sowie die Koexpression von CEACAM6 beschrieben wurde, weisen diese Befunde darauf hin, dass die Regulation der CEACAM1-vermittelten Effekte auf Lymphozyten komplexer ist, als bisher angenommen.

Durch die erstmalige Verwendung eines physiologischen CEACAM1-Liganden, in Form von löslichem CEACAM8, konnten wir CEACAM1 als einen potenten kostimulatorischen Rezeptor der B-Zell-Rezeptor-vermittelten Zellproliferation in naiven B-Zellen identifizieren. Gleiches konnte auch für naive T-Zellen gezeigt werden. Interessanterweise fanden wir, dass lösliches CEACAM8 auf zuvor durch Zytokine aktivierte Lymphozyten keinen kostimulatorischen Effekt mehr hat. Dies weist auf einen funktionellen Unterschied der CEACAM1-vermittelten Signale zwischen naiven und aktivierten Lymphozyten *in vivo* hin. Eine mögliche Erklärung hierfür sind die oben beschriebenen Veränderungen im CEACAM-Expressionsmuster durch Zellaktivierung. In dieser Arbeit charakterisierten wir das von Granulozyten ausgeschüttete lösliche CEACAM8 somit erstmalig als neuen potenten Effektor der Immunantwort. Der in dieser Arbeit gezeigte kostimulatorische Effekt von löslichem CEACAM8 auf die Proliferation naiver Lymphozyten weist auf seine potentielle Rolle als Modulator von Entzündungen, Autoimmunerkrankungen oder Wundheilungsprozessen hin. Hierdurch ergeben sich möglicherweise neue Ansätze für pathophysiologische Zusammenhänge und pharmakologische Interventionsmöglichkeiten immunologisch bedingter Erkrankungen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Beauchemin, N., Draber, P., Dveksle, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarström, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S.H., Lucka, L., Najjar, S.M., Neumaier, M., Öbrink, B., Shively, J.E., Skubitz, K.M., Stanners, C.P., Thomas, P., Thompson, J.A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S., Zimmermann, W. (1999): Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* 252, 243-249.
- (2) Bennett, S., Breit, S.N. (1994): Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J. Leukoc. Biol.* 56, 236-240.
- (3) Berends, C., Dijkhuizen, B., de Monchy, J.G., Gerritsen, J., Kauffman, H.F. (1994): Induction of low density and up-regulation of CD11b expression of neutrophils and eosinophils by dextran sedimentation and centrifugation. *J. Immunol. Methods.* 167, 183-193.
- (4) Boulton, I.C., Gray-Owen, S.D. (2002): Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 3, 229-236.
- (5) Brümmer, J., Ebrahimnejad, A., Flayeh, R., Schumacher, U., Löning, T., Bamberger, A.M., Wagener, C. (2001): Cis interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta (3). *J. Pathol.* 159, 537-46.
- (6) Brusko, T.M., Wasserfall, C.H., Hulme, M.A., Cabrera, R., Schatz, D., Atkinson, M.A. (2009): Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. *PLoS One.* 4, e7980.
- (7) Chen, C.J., Shively, J.E. (2004): The cell-cell adhesion molecule carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 inhibits IL-2 production and proliferation in human T cells by association with Src homology protein-1 and down-regulates IL-2 receptor. *J. Immunol.* 172, 3544-3552.
- (8) Chen, D., Iijima, H., Nagaishi, T., Nakajima, A., Russell, S., Raychowdhury, R., Morales, V., Rudd, C.E., Utku, N., and Blumberg, R.S. (2004): Carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 isoforms alternatively inhibit and costimulate human T cell function. *J. Immunol.* 172, 3535-3543.
- (9) Chen, T., Zimmermann, W., Parker, J., Chen, I., Maeda, A., Bolland, S. (2001): Biliary glycoprotein (BGP, CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J. Leukoc. Biol.* 70, 335-340.
- (10) Donda, A., Mori, L., Shamshiev, A., Carena, I., Mottet, C., Heim, M.H., Beglinger, C., Grunert, F., Rochlitz, C., Terracciano, L., Jantschkeff, P., De, L.G. (2000): Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur. J. Immunol.* 30, 2593-2603.

- (11) Duxbury, M.S., Ito, H., Benoit, E., Ashley, S.W., Whang, E.E. (2004): CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness. *Br. J. Cancer.* 91, 1384-1390.
- (12) Ergün, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., Wurnbach, J.H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C. (2000b). CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol. Cell* 5, 311-320.
- (13) Gold, P., Freedman, S.O. (1965): Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* 121, 439-462.
- (14) Gray-Owen, S.D., Blumberg, R.S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 433-446.
- (15) Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., and Singer, B.B. (2003): CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J. Leukoc. Biol.* 74, 126-134.
- (16) Hammarström, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* 9, 67-81.
- (17) Hanenberg, H., Baumann, M., Quentin, I., Nagel, G., Grosse-Wilde, H., von Kleist, S., Göbel, U., Burdach, S., Grunert, F. (1994): Expression of the CEA gene family members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B-cell origin. *Leukemia* 8, 2127-2133.
- (18) Herold, Gerd und Mitarbeiter (2009): Innere Medizin. Aufl. 2009 Köln: Herold, Gerd Verlag.
- (19) Janeway, C.A., Travers, A., Walport, M., Shlomchik, M. (2002): Immunologie. 5. Aufl. New York, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akadem. Verl.
- (20) Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S., von Kleist, S. (1998): Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 28, 3664-3674.
- (21) Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Neshat-Vahid, S., Irmak, S., Obst-Pernberg, K., Wurnbach, J.H., Loges, S., Kilic, E., Weil, J., Lauke, H., Tilki, D., Singer, B.B., Ergün, S. (2007): Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1. *Blood* 110, 4223-4233.
- (22) Kuroki, M., Matsushita, H., Matsumoto, H., Hirose, Y., Senba, T., and Yamamoto, T. (1999): Nonspecific cross-reacting antigen-50/90 (NCA-50/90) as a new tumor marker. *Anticancer Res.* 19, 5599-5606.

- (23) Kuroki, M., Matsuo, Y., Kinugasa, T., Matsuoka, Y. (1992): Augmented expression and release of nonspecific cross-reacting antigens (NCAs), members of the CEA family, by human neutrophils during cell activation. *J. Leukoc. Biol.* 52, 551-7.
- (24) Lobo, E.O., Zhang, Z., Shively, J.E. (2009): Pivotal advance: CEACAM1 is a negative coreceptor for the B cell receptor and promotes CD19-mediated adhesion of B cells in a PI3K-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* 86, 205-218.
- (25) Lucka, L., Fernando, M., Grunow, D., Kannicht, C., Horst, A.K., Nollau, P., Wagener, C. (2005): Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology* 15, 87-100.
- (26) Müller, M.M., Klaile, E., Vorontsova, O., Singer, B.B., Öbrink, B. (2009a): Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. *J. Cell Biol.* 187, 569-581.
- (27) Nakajima, A., Iijima, H., Neurath, M.F., Nagaishi, T., Nieuwenhuis, E.E., Raychowdhury, R., Glickman, J., Blau, D.M., Russell, S., Holmes, K.V., Blumberg, R.S. (2002): Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J. Immunol.* 168, 1028-1035.
- (28) Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P., Wagener, C. (1993): Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10744-10748.
- (29) Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V. (2008): Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34-47.
- (30) Nouvion, A.L., Oubaha, M., Leblanc, S., Davis, E.C., Jastrow, H., Kammerer, R., Breton, V., Turbide, C., Ergün, S., Gratton, J.P., Beauchemin, N. (2010): CEACAM1: a key regulator of vascular permeability. *J. Cell Sci.* 123, 4221-4230.
- (31) Öbrink, B. (2008): On the role of CEACAM1 in cancer. *Lung Cancer* 60, 309-12.
- (32) Öbrink, B. (1997): CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 616-626.
- (33) Pan, H., Shively, J.E. (2010): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulates granulopoiesis by inhibition of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Immunity*. 33, 620-631.
- (34) Pantelic, M., Kim, Y.J., Bolland, S., Chen, I., Shively, J., Chen, T. (2005): *Neisseria gonorrhoeae* kills carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CD66a)-expressing human B cells and inhibits antibody production. *Infect. Immun.* 73, 4171-4179.

- (35)Poe, J.C., Haas, K.M., Uchida, J., Lee, Y., Fujimoto, M., Tedder, T.F. (2004): Severely impaired B lymphocyte proliferation, survival, and induction of the c-Myc:Cullin 1 ubiquitin ligase pathway resulting from CD22 deficiency on the C57BL/6 genetic background. *J. Immunol.* 172, 2100-2010.
- (36)Poy, M.N., Yang, Y., Rezaei, K., Fernström, M.A., Lee, A.D., Kido, Y., Erickson, S.K., Najjar, S.M. (2002): CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat. Genet.* 30, 270-276.
- (37)Ruoslahti, E., Öbrink, B. (1996): Common principles in cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 227, 1-11.
- (38)Sadarangani, M., Pollard, A.J., Gray-Owen, S.D. (2011): Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic *Neisseria*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 498-514.
- (39)Scholzel, S., Zimmermann, W., Schwarzkopf, G., Grunert, F., Rogaczewski, B., Thompson, J. (2000b): Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am. J. Pathol.* 156, 595-605.
- (40)Schumann, D., Chen, C.J., Kaplan, B., Shively, J.E. (2001): Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* 276, 47421-47433.
- (41)Singer, B.B., Scheffrahn, I., Kammerer, R., Suttorp, N., Ergün, S., Slevogt, H. (2010): Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 5, e8747.
- (42)Singer, B.B., Klaile, E., Scheffrahn, I., Müller, M.M., Kammerer, R., Reutter, W., Öbrink, B., Lucka, L. (2005): CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur. J. Immunol.* 35, 1949-1959.
- (43)Singer, B.B., Scheffrahn, I., Heymann, R., Sigmundsson, K., Kammerer, R., Öbrink, B. (2002): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *J. Immunol.* 168, 5139-5146.
- (44)Singer, B.B., Scheffrahn, I., Öbrink, B. (2000): The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res.* 60, 1236-1244.
- (45)Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'guessan, P.D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., m Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N., Singer, B.B. (2008): CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat. Immunol.* 9, 1270-1278.

- (46) Stocks, S.C., Ruchaud-Sparagano, M.H., Kerr, M.A., Grunert, F., Haslett, C., Dransfield, I. (1996): CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur. J. Immunol.* 26, 2924-2932.
- (47) Svenberg, T. (1976b): Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int. J. Cancer* 17, 588-596.
- (48) Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A. (1994): The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today* 15, 479-483.
- (49) Turbide, C., Kunath, T., Daniels, E., Beauchemin, N. (1997): Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res.* 57, 2781-2788.
- (50) Yoon, J., Terada, A., Kita, H. (2007): CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J Immunol.* 179, 8454-8462.
- (51) Zhao, L., Xu, S., Fjaertoft, G., Pauksen, K., Hakansson, L., Venge, P. (2004): An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo. *J. Immunol. Methods* 293, 207-214.

ANHANG

1. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	T-Zell-Stimulation: Antikörper/Fc-Konstrukte und ihre jeweilige Endkonzentration	38
Tabelle 2	B-Zell-Stimulation: Antikörper/Fc-Konstrukte und ihre jeweilige Endkonzentration	39
Tabelle 3	Bestandteile von Sammelgel und Trenngel	41
Tabelle 4	Komponenten und Mengenangaben für den PCR-Reaktionsansatz	46
Tabelle 5	Temperatur und Dauer der einzelnen PCR-Zyklen	46
Abbildung 1	Die vier Hauptvertreter der Adhäsionsmoleküle	1
Abbildung 2	Struktur und potentiell Glykosylierungsmuster der Hauptvertreter der CEACAM-Familie	3
Abbildung 3	Die CEACAM1-Splice-Varianten	5
Abbildung 4	Intrazelluläre Dimerisierung und Komplexbildung von CEACAM1	6
Abbildung 5	Inter- und intrazelluläres Bindungsmuster von CEACAM1	8
Abbildung 6	Dichtegradientenzentrifugation zur Separation von PBMCs und PMN	30
Abbildung 7	FACS-Analyse der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMC- und PMN-Fraktion	35
Abbildung 8	Direkte und indirekte Fluoreszenzmarkierung im Vergleich	36
Abbildung 9	Relative Verteilung der PBMC-Subpopulationen (Tag 0)	49
Abbildung 10	Zellmorphologische Veränderung von PBMCs durch Stimulation	50
Abbildung 11	Vergleich des Aktivierungszustandes stimulierter PBMCs	51
Abbildung 12	Überlebensraten und Verteilung der PBMC-Subpopulationen nach Stimulation	52
Abbildung 13	Konstitutive CEACAM1-Expression auf frisch isolierten, naiven PBMCs (Tag 0)	54
Abbildung 14	CEACAM1-Oberflächenexpression auf aktivierten PBMCs	55
Abbildung 15	Zeitverlauf der CEACAM1-Expression in aktivierten PBMCs	56
Abbildung 16	CEACAM6-Oberflächenexpression auf PBMCs	58
		94

Abbildung 17	Zeitverlauf der CEACAM6-Expression in aktivierten PBMCs	60
Abbildung 18	Analyse der CEACAM1- und CEACAM6-Expression in PBMCs im Western Blot	63
Abbildung 19	Analyse der CEACAM1-Isoformen und des CEACAM6-Expressionsmusters in PBMCs mittels PCR	65
Abbildung 20	Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation in frisch isolierten, nicht-monozytenfreien PBMCs	68
Abbildung 21	Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation in frisch isolierten, monozytenfreien PBMCs	70
Abbildung 22	Effekt von löslichem CEACAM8 auf die T-Zell-Proliferation in frisch isolierten PBMCs	72
Abbildung 23	Effekt von löslichem CEACAM8 auf die B-Zell-Proliferation in zuvor aktivierten, monozytenfreien PBMCs	73
Abbildung 24	Effekt von löslichem CEACAM8 auf die T-Zell-Proliferation in zuvor aktivierten, monozytenfreien PBMCs	75

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ah	anti-human
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
as	<i>antisense</i>
α	anti-human
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
B-Zellen	B-Lymphozyten
BZR	B-Zell-Rezeptor
°C	Grad Celcius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAMs	<i>carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell-adhesion molecules</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Deoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Erk	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FcR	Fc-Rezeptor (Fc = <i>crystallisable fragment</i>)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	<i>N</i> -Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerretichperoxidase)
I.E.	internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IR	Insulin-Rezeptor
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ko	Kontrolle
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol/Liter
mg	Milligram (=10 ⁻³ g)
ml	Milliliter (=10 ⁻³ l)
mM	Millimol/Liter
mmol	Millimol (=10 ⁻³ mol)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
µg	Microgram (=10 ⁻⁶ g)
µl	Microliter (=10 ⁻⁶ l)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
OD	optische Dichte
OmpP5	<i>outer membrane protein P5</i>
Opa-Protein	<i>opacity-associated-Protein</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PJ	Propidiumjodid
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>
PSG	<i>pregnancy-specific glycoprotein</i>
rh	rekombinant-human
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
s	<i>sense</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHP-1	SH2 enthaltende Tyrosin-Phosphatase
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
T _{ann}	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAE-Laufpuffer	Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zellen	T-Lymphozyten
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Units
UspA1	<i>ubiquitous surface protein A1</i>
UV	Ultra Violet
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
Vol	Volumen
(v/v)	<i>volume/ volume</i>
(w/v)	<i>weight/ volume</i>
λ	Wellenlänge des Lichtes

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün möchte ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Verwirklichung der Dissertationsarbeit danken. Sein Interesse hinsichtlich der Förderung seiner Doktoranden war sehr motivierend.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Bernhard B. Singer für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Einarbeitung in die experimentellen Methoden und Thematiken. Mit scheinbar unerschöpflicher Geduld stand er mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite. Seine stets verlässliche und engagierte Beratung sowie die konstruktiven Anregungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Birgit Maranca-Hüwel möchte ich mich für die fachlich kompetente Unterstützung zur Durchführung der Experimente und die zahlreichen wertvollen Hinweise zur Versuchsdurchführung bedanken. Auch Frau Dr. hum. biol. Inka Scheffrahn danke ich für die Zurverfügungstellung der in dieser Arbeit verwendeten Primer-Sequenzen.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere bei Dr. rer. nat. Harrison Muturi, Jaqueline Klein und Mohamed Benchellal. Sie alle waren jederzeit hilfsbereit und hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen. Ebenso gilt mein Dank Frau Sinduja Gunasekeran, mit der ich mein Schicksal als Doktorandin teilen konnte.

Nicht zuletzt und von ganzem Herzen möchte ich meiner lieben Familie danken. Ohne ihre motivierende Unterstützung wäre die Durchführung und Vollendung der Arbeit nicht möglich gewesen.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in dieser Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.